Borotungstat'ın Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Hira Uğurlugüngör

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2019

Determination of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Borotungstate on Lung Cancer Cell Lines

Hira Uğurlugüngör

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

December 2019

Borotungstat'ın Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Hira Uğurlugüngör

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan
Aralık 2019

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hira UĞURLUGÜNGÖR'ÜN YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Borotungstat'ın Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan

İkinci Danışman :

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Pınar Öztopcu Vatan

Üye: Prof. Dr. Mediha Canbek

Üye: Prof. Dr. Berrin Ayaz Tüylü

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum "Borotungstat'ın Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi " başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi, tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 30.12.2019

Hira UĞURLUGÜNGÖR

İmza

ÖZET

Polioksometalatlar (POMs), moleküler çeşitlilik gösteren, çeşitli elementlerle birleşikler oluşturabilen metal oksijen kümeleridir. Bu çalışmada ilk olarak bir polioksometalat olan borotungstat maddesinin, 10, 25, 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarındaki hücre canlılığındaki azalma iki farklı insan akciğer kanseri (A549 ve H460) hücrelerinde MTT yöntemi ile incelenmiştir. 24 ve 48 saatteki A549 hücrelerindeki IC_{50} değeri sırasıyla 60 ve 37 µM olarak hesaplanırken, H460 hücrelerinde 51 ve 31 µM olarak hesaplanmıştır.

Uygulanan 10 µM borotungstat konsantrasyonunun A549 ve H460 hücre morfolojisi üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmezken, 25, 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarının doz artışına bağlı olarak hücrelerin morfolojisinde değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada karboplatin ile birlikte verilen borotungstat konsantrasyonlarının (1:1) sinerjistik/antogonistik/ etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Borotungstat ile karboplatin uygulamasının özellikle 24 saatte H460 hücre dizisi üzerinde daha fazla sitotoksik aktiviteye neden olduğu ve doz artışına bağlı olarak sinerjistik etkinin arttığı tespit edilmiştir. Benzer etki A549 hücre dizisinde de gözlenmiş olmakla beraber bu sinerjistik etkinin daha zayıf olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada son olarak 25, 50 ve 75 µM borotungstat konsantrasyonlarının oluşturduğu apoptotik/nekrotik etkiyi belirlemek için Hücre Ölümü Belirleme Kiti kullanılmıştır. A549 ve H460 hücre dizisinde apoptotik hücre ölümü görülürken, herhangi bir nekrotik etki gözlenmemiştir. Çalışmada elde edilen veriler borotungstatın akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilir ilaç olarak geliştirilmesinde, yapılacak olan araştırmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Borotungstat, polioksometalat, akciğer kanseri, sitotoksisite

SUMMARRY

Polyoxometalates (POMs) are metal oxide clusters that exhibit molecular diversity and make compounds with various elements. Cytotoxic and apoptotic effects of borotungstate, a polyoxometalate synthesized with boron for the first time, were investigated in A549 and H460 cells at concentrations of 10, 25, 50, 75 and 100 µM. Borotungstate reduced survival of A549 and H460 cells. The half maximal inhibitory concentration values of borotungstate in A549 cells were 60 µM for 24 hours and 37 µM for 48 hours. In H460 cells, it was calculated as 51 µM for 24 hours and 31 µM for 48 hours.

Borotungstate changed the morphology of A549 and H460 cells starting from 25 µM compared to the control group. In combined therapy, borotungstate and carboplatin concentrations (1: 1) were given and the antogonistic / synergistic effects were investigated via MTT method. Borotungstate and carboplatin produced more cytotoxic activity on the H460 cell line in 24 hours. A similar effect was observed in the A549 cell line. However, the synergistic effect was found to be weaker.

Borotungstate concentrations achieved cytotoxic activity in A549 and H460 cells by apoptotic route. Borotungstate caused more apoptotic cell death in A549 cells with increased concentration. Borotungstate did not cause any necrotic activity in A549 and H460 cells.

We believe that in the development of borotungstate as a usable drug in the treatment of lung cancer, it will lead to in vivo and in vitro studies.

Keywords: Borotungstate, polyoxometalate, lung cancer, cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgilerini, deneyimlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve her daim katkıda bulunan çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN'a

Laboratuvar çalışmalarım boyunca tecrübeleriyle bana destek olan çalışma arkadaşlarım Fulya PAK ve Merve YILDIZ'a,

Tez yazım dönemimde desteklerini benden esirgemeyen sayın onkolog hekimlerim Prof. Dr. Bülent YALÇIN ile Uzm.Dr.Yakup ERGÜN'e,

Son olarak manevi ve maddi desteklerini benden esirgemeyen, her daim yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **vi**
SUMMARY ..... **vii**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI **3**
2.1. Kanser Nedir? 3
2.2. Akciğer Kanseri 5
2.2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri 8
2.3. Bor, Bor Bileşikleri ve Kullanım Alanları 11
2.4. Polioksometalatlar ve Genel Özellikleri 15
2.5. Borotungstat 18
3. MATERYAL VE YÖNTEM **20**
3.1. Deneylerde Kullanılan Hücre Dizilerinin Temini ve Çoğaltılması 20
3.2. Hücre Dizilerinin Kültüre Alınması 20
3.3. Hücre Dizilerinin Pasajlanması 20
3.4. Hücrelerin Sayımı 21
3.5. Hücrelerin Ekilmesi ve İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması 21
3.6. Hücrelerin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi 23
3.7. MTT Analizi İle Sitotoksik Aktivitenin Araştırılması 23
3.8. Borotungstat ve Karboplatin Konsantrasyonlarının Kombine Olarak Uygulanması 25
3.9. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi 25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **27**
4.1. Borotungstatın A549 ve H460 Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi 27
4.2. Borotungstatın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 30

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3. Karboplatinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 33
4.4. Borotungstat ve Karboplatin Konsantrasyonlarının Kombine Olarak Uygulanması 37
4.5. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi 42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 46
KAYNAKLAR DİZİNİ 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. 2018 yılında dünya çapında kanser çeşitleri her iki cinsiyette ve tüm yaş aralıklarını kapsayan vaka sayısı 4
2.2. 2018 yılında Türkiye genelinde, her iki cinsiyette ve tüm yaş aralıklarını kapsayan kanser vaka sayısı. 4
2.3. 2015 yılı itibari ile 100.000 kişide yapılan genel tarama sonuçlarına göre Türkiye'de belirlenen ilk 10 kanser çeşidi..... 5
2.4. Akciğer kanseri bulgusunda sıklıkla karşılaşılan belirtiler. 7
2.5. Akciğer kanseri türleri ve oluşum bölgeleri 7
2.6. Polioksometalat tiplerinin polihedral gösterimleri 15
2.7. K_{16} [Ni (H_2O) $_6$]$_2$[$BW_{12}O_{40}$]$_4$.48H_2O 18
3.1. Mitokondride MTT boyasının formazana indirgenme reaksiyonu 24
4.1. 24 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının A549 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 27
4.2. 48 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının A549 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi.....28
4.3. 24 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının H460 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 29
4.4. 48 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının H460 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 30
4.5. A549 hücreleri üzerindeki borotungstat konsantrasyonlarının sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. 31
4.6. H460 hücreleri üzerindeki borotungstat konsantrasyonlarının sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 32
4.7. Sisplatin (a) ve karboplatinin (b) kimyasal yapısı 34
4.8. A549 hücreleri üzerindeki karboplatin dozlarının sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. 35
4.9. H460 hücreleri üzerindeki borotungstat konsantrasyonlarının sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 36
4.10. A549 hücrelerinde 24 ve 48 saat süre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi.....38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.11. H460 hücrelerinde 24 ve 48 saat süre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 40
4.12. Borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat süre boyunca muamele edilen A549 hücrelerinde oluşan apoptotik DNA fragmentasyon oranları 42
4.13. Borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat süre boyunca muamele edilen H460 hücrelerinde oluşan apoptotik DNA fragmentasyon oranları 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Dünya Bor Rezervlerinin Ülkelere Göre Dağılımı 12
3.2. Borotungstat konsantrasyonları 22
3.3. Karboplatin dozları……..... 22
4.1. A549 hücrelerinde borotungstat ile karboplatin kombine tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik hücre sağkalım oranları.....39
4.2. H460 hücrelerinde borotungstat ile karboplatin kombine tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik hücre sağkalım oranları…….....40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
˚C	Celcius degree (Santigrat derece)
µL	Mikrolitre (10^{-6} litre)
µm	Mikrometre (10^{-6} metre)
µM	Mikromolar (10^{-6} molar)
cm^2	Santimetrekare
dk	Dakika
gr	Gram
mL	Mililitre (10^{-3} litre)
mM	Milimolar (10^{-3} molar)
nm	Nanometre
rpm	Rounds per minute (dakikadaki devir sayısı)
g	Gravity (göreceli santrifüj kuvveti)

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
5-FU	5-Fluourasil
A549	İnsan akciğer karsinomu hücre dizisi
ABD	Amerika birleşik devletleri
ABTS	2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit)
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ATCC	Amerikan kültür koleksiyonu
B	Bor
B_2O_3	Bor Oksit
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklamalar
EFSA	European Food Safety Authority
FBS	Fetal dana serumu
H460	İnsan büyük hücreli akciğer karsinomu
HeLa	İnsan serviks karsinom hücre dizisi
HBSS	Hank’s Balance Salt Solution (Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu)
IARC	Uluslararası Kanser Ajansı
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Mo	Molibden
MTT	3-(4, 5-Dimetiltriazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolium bromid
MTS	3-(4, 5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3karboksimetoksifenil)-2-(4-sülffenil)-2H-tetrazolyum
MCF7	İnsan meme karsinom hücre dizisi
Nb	Niyobyum
PBS	Fosfat buffer saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
POM	Polioksometalat
Sb	Antimon
V	Vanadyum
Vd.	Ve diğerleri
W	Tungsten
DSÖ	Dünya sağlık örgütü

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; 2018 yılında dünya genelinde tahmini 18,1 milyon yeni vaka ve 9,6 milyon ölümden sorumludur (Bray vd., 2018). Dünya genelinde 2030 yılına kadar kanserli yeni vaka sayısının 21,6 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (WHO, 2017).

Dünya genelinde her iki cinsiyette en sık tanı alan kanser türü akciğer kanseridir. Teşhisi konulan yeni vakaların yaklaşık %11,6'lık kısmını akciğer kanseri oluşturmaktadır. Aynı zamanda kansere bağlı ölümlerde %18,4 ile ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin tedavisinde yaygın olarak cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır. Fakat başarı oranı bakımından yeterli olduğu söylenemez.

Polioksometalatlar (POM'lar), moleküler çeşitlilik gösteren, çeşitli elementlerle bileşikler oluşturabilen metal oksijen kümeleridir (Changgen vd., 2011). Son on yıl içinde, çeşitli polioksometalatların antiviral, anti bakteriyel ve antitümöral gibi farklı biyolojik etkinliklerinin belirlenmesi bu maddelere karşı olan ilgiyi arttırmıştır.

Çalışmada ilk kez bor kullanılarak sentezlenen bir polioksometalat türü olan borotungstat maddesinin, farklı konsantrasyonlardaki hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkileri incelenmiştir.Yapılan çalışmada denenen konsantrasyonların hem A549 hem de H460 hücrelerindeki hücre yaşam oranını azaltmıştır. A549 hücrelerinde, hesaplanan IC_{50} değerleri sırasıyla 60 ve 37 µM olarak belirlenmiştir. H460 hücrelerinde IC_{50} değeri sırasıyla 51 ve 31 µM olarak yirmi dört ve kırk sekiz saat için belirlenmiştir.

Uygulanan 10 µM borotungstat konsantrasyonlarının A549 ve H460 hücre morfolojisi üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmezken, 25, 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarının doz artışına bağlı olarak hücrelerin morfolojisinde değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca borotungstat ile karboplatin dozları birlikte verilerek sinerjistik /antogonistik etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Borotungstat ile karboplatin uygulamasının özellikle 24 saatte H460 hücre dizisi üzerinde daha fazla sitotoksik aktiviteye neden olduğu ve doz artışına bağlı olarak bu sinerjistik etkinin artığı tespit edilmiştir. Benzer etki A549 hücre dizisinde de gözlenmiş olmakla beraber bu sinerjistik etkinin daha zayıf olduğu belirlenmiştir

Uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının her iki hücre hattında da sitotoksik aktiviteyi apoptotik yolla gerçekleştirdiği belirlenmiştir. A549 hücre dizisinde bu etki konsantrasyon artışına bağlı olarak yükselmişken, H460 hücre dizisinde böyle bir etkiden bahsetmek mümkün olmamıştır. Özellikle borotungstatın A549 hücre dizisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak daha fazla apoptotik hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre dizisinde de borotungstatın herhangi bir nekrotik etkiye neden olmadığı da yapılan çalışma ile gösterilmiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler ışığında, borotungstatın akciğer kanserinin tedavisinde kullanılabilir/geliştirilebilir bir kemoterapötik ajan olması ile ilgili temel bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

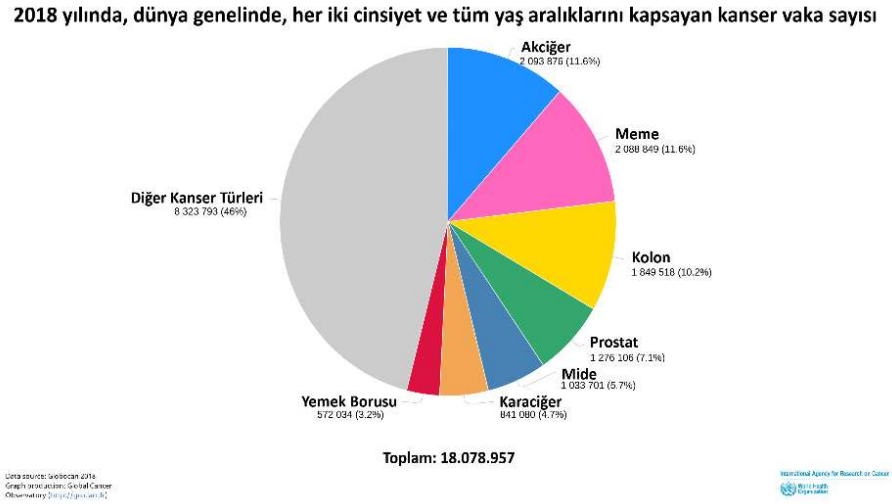
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser Nedir?

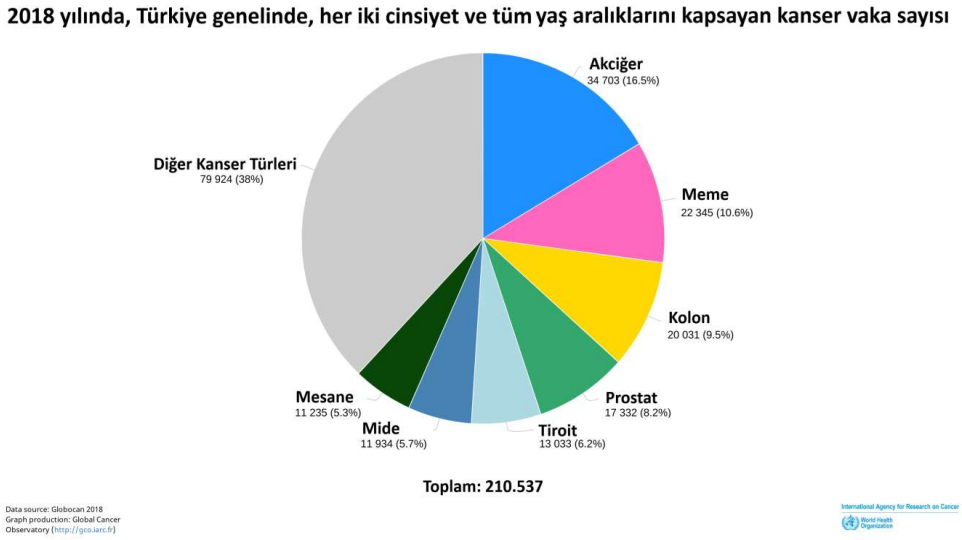
Kanser, çeşitli faktörler sonucu normal hücrelerin farklılaşarak kontrolsüz olarak çoğalması ile tanımlanan, kanserli hücrelere dönüşmesi ile ortaya çıkan hastalığa verilen genel isimdir (Erdem vd., 2017). Bulaşıcı olmayan hastalıklar günümüzde küresel çapta ölümlerin çoğundan sorumludur. Kanser 21. yüzyılda dünyanın her ülkesinde yaşam beklentisinin artmasının önündeki en önemli engel olarak görülmektedir. Bunun sebebi kanserin insidansı ve mortalitesinin dünya çapında hızla artmasıdır. Dünya genelinde; Avrupa, toplam kanser vakalarının % 23,4'ünü, Amerika ise % 21'ini oluşturmaktadır. Asya %57,3 ile kansere bağlı ölümlerde, görülme sıklığı en fazla olan bölgedir (Bray vd., 2018).

Kanserin dünya genelinde morbiditenin önde gelen bir nedeni olduğunu ve yıllık yeni kanser vakalarının sayısıyla birlikte artan bir halk sağlığı sorununu kabul ederek, 2012'de kayda geçen 14,1 milyon yeni vaka sayısının 2030 yılına kadar 21,6 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (WHO, 2017).

Dünya genelinde her iki cinsiyette de akciğer kanseri en sık tanı alan kanser türüdür. Toplam yeni vakaların %11,6'sını oluşturur. Bunu takiben insidansı en yüksek kanserler sırasıyla meme kanseri, kolorektal kanserler ve prostat kanseri şeklindedir. Kansere bağlı mortalite oranları ise akciğer kanserinden sonra sırasıyla kolorektal kanser (%9,2), mide kanseri (%8,2) ve karaciğer kanseri (%8,2) şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 2,1) (Bray vd., 2018).



Şekil 2.1. 2018 yılında dünya çapında her iki cinsiyeti ve tüm yaş aralıklarını kapsayan kanserli vaka sayısı (Bray vd., 2018).

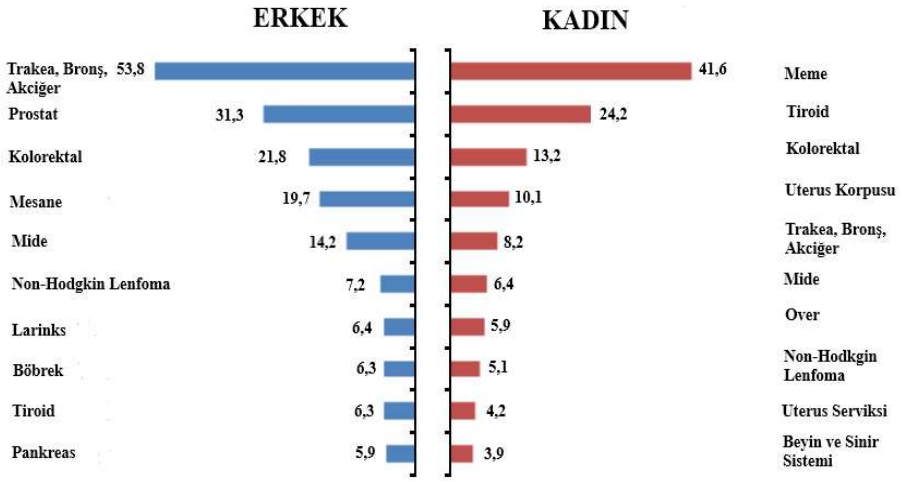


Şekil 2.2. 2018 yılında Türkiye genelinde, her iki cinsiyeti ve tüm yaş aralıklarını kapsayan kanserli vaka sayısı (Bray vd., 2018).

Türkiye de her iki cinsiyeti ve tüm yaş gruplarını kapsayan, en sık görülen beş kanser türü sırasıyla; akciğer, meme, kolorektal, prostat ve tiroid kanserleridir (Şekil 2.2).

2018 yılı verilerine göre Türkiye de tüm yaş aralıklarında ve her iki cinsiyeti de kapsayan toplam 210.537 yeni kanser vakası bulunmaktadır. Ölüm sayısı ise 116.710 kişi olarak belirlenmiştir. Erkeklerde kanserli yeni vaka sayısı 118.882 iken kadınlarda 91.655 kişidir. Erkeklerde kansere bağlı ölüm sayısı 74.542 iken kadınlarda 42.168 kişidir (WHO, 2019).

Türkiye de 100.000 kişide yapılan genel tarama sonuçlarına göre erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri ilk sırada yer alırken, kadınlarda meme kanseri en çok görülen kanser türüdür (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 2015 yılı itibari ile 100.000 kişide yapılan genel tarama sonuçlarına göre Türkiye'de belirlenen ilk 10 kanser çeşidi, (T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2015).

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, çevresel maruziyetlerden etkilenen, hastalık gelişimi ve ilerlemesinde genetik ya da epigenetik faktörlerin rol aldığı heterojen bir hastalıktır (Yang vd., 2020). Akciğer kanseri dünya çapında teşhis edilen en yaygın kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin en büyük nedeni olmaya devam etmektedir.

Hastalık yükü, nüfus artışı, yaşlanma ve sigara içme davranışı uluslararası değişkenlik göstermektedir. Akciğer kanserinde önemli olan bu faktörler sebebiyle küresel çapta akciğer kanseri epidemiyolojisi sürekli takip edilmelidir.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa Birliği gibi büyük ve gelişmiş ülkelerde akciğer kanseri epidemiyolojisi düzenli olarak rapor edilmektedir. Dünya da tüm akciğer kanseri vakalarının %49'u sosyoekonomik ve sosyokültürel açıdan az ya da orta gelişmiş ülkelerde görülmektedir (Cheng vd., 2016).

1960'lı yıllardan beri akciğer kanseri erkeklerde başlıca kansere bağlı ölüm sebebi olmasına rağmen, 1990'lı yıllardan beri kadınlarda da kansere bağlı ölümlerde meme kanserine eş değer oranlardadır (Reck vd., 2014).

Dünya genelinde, erkeklerde akciğer kanseri Doğu Avrupa (özellikle eski Sovyetler Birliği'nde), Batı Asya, Kuzey Afrika, Doğu Asya (Çin) ve Güney-Doğu Asya (Myanmar, Filipinler ve Endonezya) başta olmak üzere birçok ülkede kansere bağlı başlıca ölüm nedenidir (Bray vd., 2018).

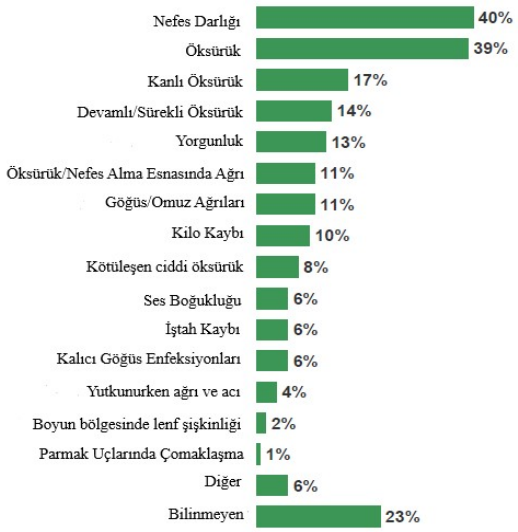
Dünya genelinde kadınlar arasında akciğer kanserinin yüksek insidans oranları, Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa'da (özellikle Danimarka ve Hollanda'da) ve Avustralya / Yeni Zelanda'da görülmektedir. Cinsiyete göre farklılık eğilimleri göz önüne alındığında, kadın ve erkeklerde oranların birçok Avrupa ülkesinde birbirine yakınlaştığı görülmektedir. ABD'de akciğer kanseri insidansı oranları genç kadınlar arasında genç erkeklere göre daha yüksektir (Bray vd., 2018).

Akciğer kanseri, dünya genelinde hem insidans hem de mortalite açısından hala artmaktadır. Bununla birlikte etkili tütün kontrol önlemlerine sahip ülkelerde, yeni akciğer kanseri insidansı azalmaya başlamıştır (Reck vd., 2014).

Tütün kullanımı, %80'lik bir oranla, vakalarda akciğer kanserinin ana nedenidir. Asbest, arsenik, radon ve tütünle ilgili olmayan polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalma ve iç

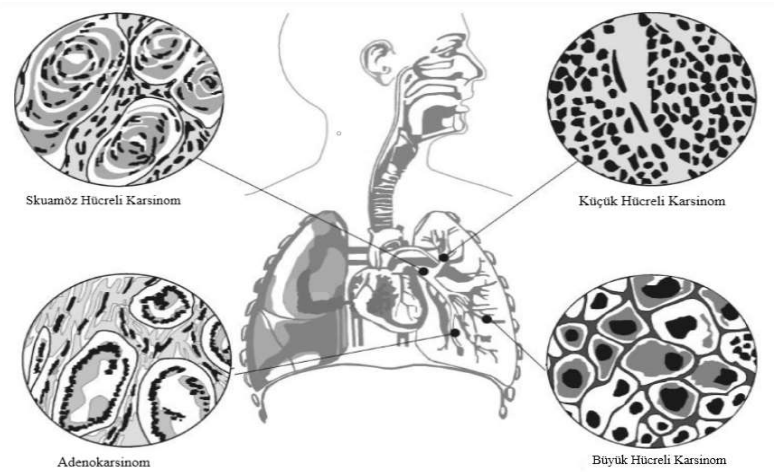
hava kirliliğine ilişkin hipotezler (örneğin, kömür yakıtlı sobalar ve pişirme dumanları) akciğer kanserinin oluşumuna öncülük eden diğer risk faktörleridir (Reck vd., 2014).

Akciğer kanseri bulgusunda görülen belirtiler şekli 2.4'de ki gibi sıralanabilir;



Şekil 2.4. Akciğer kanseri bulgusunda sıklıkla karşılaşılan belirtiler (Global Lung Cancer Coalition, 2013)

Akciğer kanserinin birbirinden patolojik olarak ayırt edilebilen iki ana formu mevcuttur. Bunlardan birincisi Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve ikincisi küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak isimlendirilmiştir (Duma vd., 2019).



Şekil 2.5. Akciğer kanseri türleri ve oluşum bölgeleri (Seyhan, 2017)

Küçük hücreli akciğer kanseri tüm akciğer kanseri alt tiplerinin sadece % 13'ünü oluşturur. Küçük hücreli akciğer kanserinin insidansı genel olarak azalmasına rağmen, kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre artmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanseri, sigara kullanımı ile en fazla ilişkili olan akciğer kanseri alt tipidir. Küçük hücreli akciğer kanseri tanısı alan hastaların% 90'ından fazlası şu anda veya geçmişte tütün kullanıcılarıdır. Küçük hücreli akciğer karsinomunun gelişme oranının günlük olarak tüketilen sigara sayısı ve sigara kullanımının başlama yaşı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Kastner vd., 2019).

Akciğer kanserinin yaklaşık %85'i küçük hücreli dışı (KHDAK) akciğer kanserleridir (Langer, 2010). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri agresif bir türdür. Tanı anında bölgesel ya da uzak metastaz sıklığı %70 kadar yüksektir (Guarino vd., 2002).

2.2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tedavisi

Akciğer kanserinin yaklaşık %85'i küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK). KHDAK, küçük hücreli bir bileşen içermeyen malign epitelyal akciğer tümörü olarak tanımlanır (Langer vd., 2010).

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin ana alt tipleri; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom şeklinde sıralanabilir.

Adenokarsinomlar en sık görülen küçük hücreli dışı akciğer kanseri türüdür. Yaklaşık olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri türlerinin %50'sini oluşturmaktadır (Langer vd., 2010).

Adenokarsinomlar, glandüler farklılaşması olan malign epitelyal tümörlerdir. Bu tümörler alveoler, bronşiyal veya bronşiyol epitel hücrelerinden türetilir. Adenokarsinomlu hastaların yaklaşık % 20'sinde tanı sırasında uzak metastazlar vardır; Yaygın metastatik bölgeler arasında beyin, kemik, adrenal bezler ve karaciğer bulunur (Langer vd., 2010).

1950 yılından bu zamana kadar, akciğer adenokarsinomu kadınlarda her zaman erkeklerden daha yaygın olarak görülmüştür. Kadınlarda adenokarsinom oranının daha yüksek olmasının nedeni, akciğer tümör dokularında östrojen steroid reseptörlerinin bulunması ve akciğer kanserinin gelişiminde hormonal faktörlerin etkinliğinin olduğuna dair çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Wynder ve Muscat, 1995). Sigara içilmesinde bir azalma olmasına rağmen, akciğer adenokarsinomu oranı diğer alt tiplere kıyasla sürekli artmaktadır (Kastner vd., 2019).

Skuamöz hücreli karsinomlar; küçük hücreli dışı akciğer kanseri türleri içinde ikinci sırada yer alır. Epidermoid karsinom olarak da isimlendirilmektedir. Skuamöz hücreli karsinomlar akciğer kanserlerinin % 25 ila% 30'unu temsil eder; hava yolu epitelinde bulunan hücrelerden ortaya çıkma eğilimindedirler (Duma vd., 2019).

Skuamöz hücreli karsinomlar, küçük hücreli dışı akciğer kanseri türlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Genellikle merkezi bir konumda bulunan skuamöz hücreli karsinomlar sigara içme öyküsü ile ilişkilidir Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (Wynder ve Muscat, 1995).

Büyük hücreli akciğer karsinomu, en az görülen küçük hücreli dışı akciğer kanseri türüdür. Büyük hücreli akciğer karsinomu, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 5 ila% 10'unu

oluşturur. Bu tümörler bol sitoplazmaya sahip büyük hücrelerden ve büyük nükleollerden oluşur (Duma vd., 2019). Morfolojik olarak iri hücrelerdir. Belirgin nükleoluslara sahip tümörlerdir (Yener, 2010). Cerrahi olarak rezeke edilen tümörler büyük hücreli akciğer karsinomları olarak kabul edilir (Kastner vd., 2019).

Çoğu akciğer kanseri sigaradan kaynaklanır, ancak bu ilişkinin gücü histolojik alt tipler arasında farklılık gösterir. Skuamöz hücreli karsinomun ve özellikle küçük hücreli akciğer kanserinin neredeyse sadece sigaraya bağlı olduğu düşünülürken, adenokarsinomların sigara ile daha az korelasyonu vardır (Kastner vd., 2019).

Geçtiğimiz on yılda akciğer kanseri teşhisi ve tedavisinde en büyük gelişmelerden biri, tedavi kararlarının hastanın tümörünün spesifik histolojik ve genetik özelliklerine dayandığı kişiselleştirilmiş tedavi yöntemleridir. Özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanserine yönelik yeni tedaviler için, tümör histolojisi hekimler adına önem teşkil etmektedir. Bu histolojik farklılıklar aynı organdan köken alsa bile farklı moleküler özellikler sergiler. Hastalığın tedavisi için bu moleküler farklılıklar göz önüne alınmalıdır.

Akciğer kanserinde başlıca üç tedavi seçeneği bulunur. Bunlar; cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapidir.

Cerrahi tedavi; kanser yaygın şekilde yayılmadıysa (evre I ve II), tümörün ameliyatla alınması şeklindedir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri için tercih edilen ve en etkili tedavi yöntemidir. Cerrahi tedavi seçeneği, radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte uygulanabildiği gibi tek başına da uygulanabilir (Duma vd., 2019).

Kemoterapi, lokal ileri ve metastatik hastalığı olan bireyler için uygundur. Akciğer kanserinin % 70'e yakını lokal ileri veya metastatiktir. Genellikle II. ve III. evrede tercih edilmektedir (Molina vd., 2008).

Küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Ancak küçük hücreli dışı akciğer kanseri sıklıkla tekrarlamaktadır. Farklı tipte akciğer kanseri

olan hastalar, farklı kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları almaktadırlar. Bunlara örnek olarak; karboplatin bazlı tedavilerden gemsitabin/karboplatin, dosetaksel/karboplatin kombine tedavileri gösterilebilir (Booton vd., 2006).

Radyoterapi, kanserli hücreleri hedefli ışınlar kullanarak öldürmeyi amaçlayan, küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde de kullanılan bir yöntemdir. İstenilen bölgeye özel tedavi imkanı sağlar. Cerrahi tedavi öncesinde tümör boyutunun küçülmesi için tercih edilmektedir (Baykara, 2016). Günümüzde, III evre akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. (Spiro ve Porter, 2002).

Akciğer kanserinin tanı ve tedavisi karmaşık olabilir. Bu sebeple günümüz de kullanılan ilaçlardan daha etkili ve normal hücreler üzerinde daha az yan etkiye sahip kimyasal maddelerin arayışı sürmektedir. Özellikle molekül odaklı akıllı ilaçlar akciğer kanseri gibi agresif hastalıklarda sıklıkla tercih edilmektedir. Bu akıllı ilaçlara örnek olarak; Tarceva 25mg (Roche), Tagrisso 40-80 mg ile Iressa 250 mg film kaplı tablet (Astra Zeneca) Zykadia 150 mg kapsül (Novartis) örnek verilebilir.

2.3. Bor, Bor Bileşikleri ve Kullanım Alanları

Bor (B), Fransız Kimyacı Gay-Lussac ve İngiliz kimyacı Humphry Davy tarafından 1808'de keşfedilmiştir (Davy, 1808). Atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81'g dir. Periyodik tablonun IIIA grubunda metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir elementtir (USEPA, 2004).

Bor doğada asla element formunda bulunmaz. ^{10}B (19.78%) and ^{11}B (80.22%) izotoplarının bir karışımı olarak bulunur. Elementel bor, oda sıcaklığında, katı halde bulunur. Saf olmadığı durumlarda sarı veya kahverengi amorf toz şeklindedir (WHO, 2009).

Dünyadaki önemli bor yatakları Türkiye, Rusya ve ABD olup dünya ticari bor rezervleri 4 bölgede toplanmaktadır. Bunlar; ABD Kaliforniya Eyaletinin güneyinde yer alan "Mojave

Çölü", Güney Amerika'da yer alan "And Kemeri", Türkiye'nin de yer aldığı "Güney-Orta Asya Orojenik Kemeri" ve Doğu Rusya'dır (Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2018).

Ülkeler	Toplam Rezerv (Bin Ton B_2O_3)	Dağılım (%)
Türkiye	948.712	73,4
Rusya	100.000	7,7
A.B.D.	80.000	6,2
Peru	22.000	1,7
Arjantin	9.000	0,7
Çin	36.000	2,8
Bolivya	19.000	1,5
Şili	41.000	3,2
Kazakistan	15.000	1,2
Sırbistan	21.000	1,6

Çizelge 2.1.Dünya bor rezervlerinin ülkelere göre dağılımı (Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2018).

Türkiye, bor cevheri rezervlerinin % 73'üne sahiptir. Aynı zamanda bor cevherlerinin kalitesi ile de dünyada ilk sırada yer almaktadır. Türkiye'yi % 7, 7'lik bir oranla Rusya takip etmektedir (Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2018).

Türkiye de bilinen bor yatakları Kırka/Eskişehir, Bigadiç/Balıkesir, Kestelek/Bursa ve Emet/Kütahya'da bulunmaktadır. Ülkemizde 2840 sayılı kanun ile bor madenlerinin üretilmesi işletilmesi ve pazarlanması ile ilgili faaliyetler Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü tarafından yürütülmektedir. (Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2018).

Dünyanın en stratejik madeni olarak kabul edilen bor, nükleer sanayi, gübre sanayi, ilaç sanayi, otomobil sanayisi gibi farklı 400'ü aşkın alanda kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda bor madeninin sağlık alanında kullanımına ilişkin önemli bilgiler elde edilmiştir.

Havada, suda ve toprakta 250'den fazla bor minerali vardır. Bor doğada serbest olarak bulunmadığı için genellikle diğer elementlerin oksitleriyle birlikte B_2O_3 (bor oksit) bulunur (Kemp, 1956).

Havada suda ve toprakta mevcut olan bor bileşikleri insanlara öncelikli olarak besinler ve içme suyu ile iletilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre içme suyunda bulunan bor miktarı 0,1-0,3 mg/L arasında değişmektedir (WHO, 1998).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) içme sularının günlük bor alımımıza 0, 2-0, 6 mg/gün olacak şekilde katkı yaptığını bildirmektedir (EFSA, 2004). Ayrıca, Amerika Gıda Takviyesi Veri Tabanına (The Dietary Supplement Label Database) göre 2357 farklı gıda takviyesinde bor bulunmaktadır (Kuru ve Yarat, 2017). Doku ve vücut sıvılarında bor elementi çoğunlukla borik asit formundadır.

Günlük bor alımı, yiyecek seçimine, bazı kişisel ürünlerin kullanımına ve suyun bor içeriğine bağlı olarak değişmektedir. Genel bor alımı için rapor edilen değerler değişebilir. Örneğin, Avrupa Birliği'nde 0, 8-1, 9 mg iken Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,7-7 mg bor alımı mevcuttur. Bu farklılıklar, yüksek enerjili gıdaların bolluğu ile lif ve bitki proteinleri bakımından zengin gıda ürünlerindeki bölgesel farklılıklardan kaynaklanabilir. Buna rağmen insan vücudu için gerekli olan bor miktarları belirsizliğini korumaktadır. Bunu bilmek borun biyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesi hakkında daha fazla bilgi verecektir. İnsanların en az 0,2 mg bora ihtiyaç duyduğu ve yenilen yemeklerin yaklaşık 1-2 mg bor içermesi önerilmektedir. Genel olarak günlük 1,5-3 mg bor alımına izin verilmektedir. Yetişkinlerde tolere edilebilir en yüksek bor alım miktarı 20 mg'dır (Scorei ve Popa, 2010).

Bor bileşiklerinin oral yolla alındığında, gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde borik aside dönüştürüldüğü, neredeyse tamamının borik asit şeklinde emilerek kan aracılığı ile dokulara dağıldığı belirtilmektedir (Jansen vd., 1984).

Bor, anyonik bir element olduğu için böbreklerden hızlı bir şekilde emilip atılır. Jansen vd., borik asidin %90-95'inin idrarla atıldığını belirtmişlerdir (Jansen vd., 1984).

Literatürlerde, insan ve hayvan dokuları üzerinde ki borun biyokimyasal mekanizması ile ilgili bilgiler yetersizdir. Ancak bilindiği kadarıyla borun, cis-hidroksil grubu bulunduran biyomoleküller (adenozin-5-fosfat, piridoksin, dehidroaskorbik asit, polisakkaritler, piridin, riboflavin vd.) ile reaksiyona girebileceği belirtilmektedir. Borun bu çeşitli biyomoleküller ile reaksiyon oluşturabilmesi ve aynı zamanda düşük atom ağırlığına sahip olması, biyolojik fonksiyonlar açısından önem teşkil etmektedir. Bununla birlikte borun hormon reseptörleri, hücre zarı fonksiyonları ve stabilitesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Kabu ve Akosman, 2013).

Düşük bor alımının birçok genel sağlık sorununa yol açtığı tespit edilmiştir. Bor eksikliğinin de en sık görülen belirtiler arasında artrit, hafıza kaybı, osteoporoz, dejeneratif ve yumuşak kıkırdak rahatsızlıkları, hormonal dengesizlik ve libidoda düşme sayılabilir (Scorei ve Popa, 2010).

Son yıllarda ise yapılan çalışmalarda borlu bileşiklerin kanserli hücrelerin çoğalması üzerindeki etkileri ile ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar da borlu bileşiklerin anti kanser aktivitesi üzerinde durulmuştur. Çalışmalarda prostat kanseri ile bor alımı arasında ters orantı olduğu tespit edilmiştir. Borik asit kullanımının, farelerde prostat tümörlerinin görülme sıklığını azalttığı rapor edilmiştir. Ancak bu korelasyonun sebebi halen belirsizliğini sürdürmektedir (Scorei ve Popa, 2010).

Bor düşük atom ağırlığına sahip olduğundan ve kimyası nötrofilik ile elektrofilik reaktivite içerdiğinden, çeşitli hastalıklara karşı antiviral, antibakteriyal ve antifungal biyomedikal uygulamalara sahip yeni bir molekül sınıfını temsil etmektedir.

Yakın gelecekte, bor içeren bazı ilaçların piyasada mevcut ilaçlardan daha iyi etkinlik ve etkiye sahip olması beklenmektedir.

Son dönemde yapılan çalışmalarda çeşitli bor içeren bileşiklerin kanserli hücrelerin çoğalması üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğu da rapor edilmiştir. Örneğin; Talabostat, borlu bir bileşiktir. Talabostat; sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini artırarak, makrofajların, nötrofillerin, T-hücresinden bağımsız olacak şekilde anti tümör aktivitesini uyararak, tümöre özgü T-hücresinin bağışıklığını arttırır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisi için docetaxel ile bir ilaç kombinasyonu olarak klinik deneylere girmiştir (Das vd.,2013).

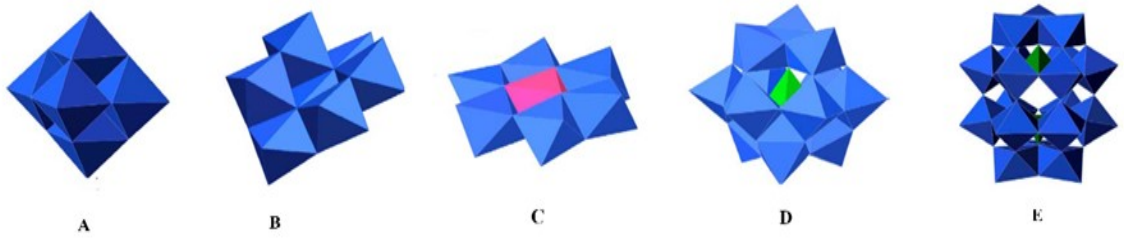
Ayrıca aktif madde olarak borla klinik kullanımda olan tek ilaç Bortezomib (Velcade®), 2003 yılında multiplmiyelom (Richardson vd., 2005) ve Hodgkin lenfomasının (Goy vd., 2005) tedavisi için proteazom inhibitörü olarak onaylamıştır.

Bortezomib'in anti kanser aktivitesi, apoptozise neden olan hücre içi kalsiyum metabolizması düzensizliğinden sorumludur. Aynı zamanda hücre döngüsünü bloke eder. Bortezomib tek başına veya kombine olarak, meme kanseri, akciğer, kolon, prostat ve pankreas gibi katı tümörlerin tedavisi için araştırılmaktadır (Das vd.,2013).

2.4. Polioksometalatlar ve Genel Özellikleri

Polioksometalatlar (POMs), analitik kimya, tıp, kataliz ve malzeme bilimi alanlarında yaygın olarak kullanılan önemli inorganik bileşiklerdir. Tungsten (W), molibden (Mo), vanadyum (V), niyobyum (Nb), antimon (Sb) vb. gibi erken geçiş metali iyonlarını içeren ve etrafında bulunan oksijen atomları ile bir küme oluşturan negatif yüklü inorganik maddelerdir (Changgen vd., 2011). Polioksometalatlar genellikle amonyum metali veya organometalik tuzlar olarak izole edilebilir (Yamase vd., 1996).

Polioksometalatlar; şekil, boyut ve yapısal özellikler açısından olağanüstü çeşitlilik sergileyen oksit anyonları ile bağlı metal katyonların oluşturduğu oksit kümeleridir. Yapısı Keggin tarafından tespit edilmiştir (Keggin, 1933).



Şekil 2.6. Polioksometalat tiplerinin polihedral gösterimleri **A.** [M6O19]n- (Lindqvist yapı), **B**. [Mo7O24]6-, **C.** [XM6O24]n- (Anderson yapı), **D.** [XM12O40]n- (Keggin yapı), **E.** [X2M18O62]n- (Dawson yapı) (Hasenknopf, 2005).

Polioksometalatlar büyüleyici yapıları ve katalitik, fotovoltaik, manyetik ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyle tıp ve malzeme bilimi alanlarında geniş ilgi çeken metal oksijen kümeleri sınıfıdır. (Menon vd., 2011). Polioksometalatların yapısına neredeyse her çeşit element eklenebilir ve bu durum çok çeşitli yapı ve özellik çeşitliliğine yol açar (Hasenknopf, 2005). Ayrıca, moleküler çeşitlilik göstermesi, kolay ve ucuz sentez edilebilmesi ise ilaç çalışmalarında kolaylık sağlamaktadır. Bununla birlikte çalışmalarda polioksometalatların hücre içine geçebildiği de rapor edilmiştir (Bijelic vd., 2019).

Polioksometalat bileşikleri 1 ile 3 nm arasında değişen boyutlara sahiptir. Bu bileşiklerin çevresine özel yüzey gruplarının eklenmesi 5 nm'den büyük boyutlu organize yapılara neden olabilir. Memeli organizmaların hücreleri tipik olarak 10-30 μM çapındadır. Bununla birlikte, subselüler organel boyutları daha küçüktür. Bu boyutların karşılaştırılması, polioksometalatların canlı sistemlerde spesifik etkileşimlere ulaşmak için ideal bileşikler olduğunu göstermektedir (Stephan vd., 2013).

İlk olarak çeşitli polioksometalatların antiviral ve anti bakteriyel gibi farklı biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir (Yamase, 2005). 1970 yılında Chermann vd., ilk olarak, fare lösemi ve sarkoma virüslerinin güçlü bir inhibitörü olan ‘silikotungstik asit süpernatantları’

bildirmişleridir (Chermann vd., 1970). O zamandan beri, birçok polioksometalat çeşidinin antiviral ve antibakteriyal ilaç potansiyeline sahip olduğu keşfedilmiştir. (Yamase, 2005).

Ayrıca, polioksometalatlar çeşitli elementler ile birleşikler oluşturabilmektedirler. Bu bağlamda, geçiş metali (W, Mo, V, Nb) ve oksijen atomlarının oluşturduğu kümeler olarak tanımlanan polioksometalatların, son yıllarda umut verici antikanser ilaç adayları olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda amino asit (Li vd., 2004), sülfanilamid (Liu vd., 1988) ve 5-florourasil (Li vd., 2005) gibi organik gruplar tarafından işlevselleştirilen polioksometalatların, önemli bir anti tümör potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Polioksometalatların anti tümör mekanizması, redoks reaksiyonuna dayanmaktadır (Yamase, 1993).

Polioksometalatların anti kanser aktivitesi ilk olarak 1965 yılında Mukherjee'nin gastrointestinal kanserli hastalar üzerinde PTMC, H_3 [$PW_{12}O_{40}$], H_3 [$PMo_{12}O_{40}$] ve kafeinin içeren bir kombinasyonu in vivo uygulaması ile belirlenmiştir. Sonuçta denenen dört hastada tümörlerin tamamen kaybolmasına neden olmasına rağmen, bu kombinasyon daha ileri klinik çalışmalara tabi tutulmamıştır (Mukherjee, 1965).

Daha sonra Jasmin vd., 1974 yılında $(NH_4)17Na$ [$NaSb_9W_{21}O_{86}$]'nın sarkoma virüsünün neden olduğu tümörlere karşı inhibe edici etkisi olduğunu rapor etmişleridir. Özellikle Yamase vd., sentezledikleri [NH_3Pri_6] [Mo_7O_{24}] (PM-8) adlı polioksometalat bileşiğinin in vitro ve vivo antikanser aktivitesine bakarak polioksometalatlar ile ilgili yapılacak çalışmalara öncülük etmiştir. PM-8, 5-floroürasil (5-FU) ve nimustin gibi onaylanmış ilaçlardan kısmen daha aktif olan farklı fare modellerinde tümör büyümesini baskılayarak in vivo olarak oldukça etkili olduğu da rapor edilmiştir (Bijelic vd., 2019).

Polioksometalatların organik gruplarla işlevselleştirilmesi, biyoaktif polioksometalatlar alanının ana odağıdır, polioksometalatlar, yüzey özelliklerinden dolayı genellikle toksik yan etkiler ve sınırlı hücre penetrasyon aktivitesi sergilerler. Organik parçaların polioksometalatlar çerçevesine dâhil edilmesi, yüzeyini, yükünü, polaritesini ve redoks özelliklerini değiştirebilir.

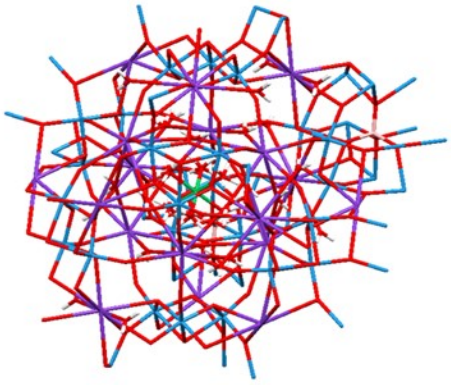
Bu durum, azaltılmış toksisite ve arttırılmış hücre penetrasyon kabiliyetine sahip tamamen yeni bir bileşiğe yol açabilir. Organik olarak modifiye edilmiş polioksometalatlar, genel olarak sulu çözeltilerde daha stabildir. Buna bağlı olarak biyolojik hedeflerle etkileşimleri daha gelişmiş ve daha spesifiktir (Bijelic vd., 2019).

Hücre çoğalmasını baskılayıcı bir ilacın antiproliferatif aktivitesi, hücresel alım derecesi ile doğrudan ilişkilidir. Polioksometalatların kanser hücrelerine nüfuz edebildiği kabul edilmektedir, çünkü birçok çalışma sitoplazmik boşluk içindeki konumlarını deneysel olarak doğrulamıştır. Polioksometalatların çoğunlukla hücreler tarafından bir çeşit endositoz tarafından alındığı varsayılmaktadır (Bijelic vd., 2019).

2.5. Borotungstat

Bir polioksometalat çeşidi olan tungsten, geçiş metalleri ile bileşik oluşturmaktadır. Deneylerde kullanılan bileşiğimiz bor geçiş metali olarak kullanılmış ve tungsten ile kararlı bir bileşik oluşturmuştur.

Molekülün kapalı formülü K_{16} [Ni (H_2O) $_6$]$_2$[$BW_{12}O_{40}$]$_4$.48H_2O şeklindedir. Molekülün açık formülü ise şekil 2.7'de belirtilmiştir (Olgun vd., 2017).



Şekil 2.7. K_{16} [Ni (H_2O) $_6$]$_2$[$BW_{12}O_{40}$]$_4$.48H_2O (Olgun vd., 2017).

Borotungstatın akciğer kanseri hücreleri üzerinde ki sitotoksik ve apoptotik etkileri ilk defa bu çalışmada araştırılmıştır.

Borotungstatın A549 ve H460 hücre dizilerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak denenmesi sonucu oluşan morfolojik değişimler incelenmiştir. Ardından, akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla tercih edilen karboplatin ile birlikte kombine verilerek akciğer kanseri hücre dizilerindeki antogonistik/sinerjistik etkinlik incelenmiştir. Son olarak borotungstatın apoptotik süreçteki etkinliği A549 ve H460 hücre dizileri üzerinde çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Hücre Dizilerinin Temini ve Çoğaltılması

Çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) çeşitlerinden insan akciğer adenokarsinomu (A549), büyük hücreli akciğer karsinomu için ise insan büyük hücreli akciğer karsinomu (H460) hücre dizisi Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) satın alınarak kullanılmıştır.

3.2. Hücre Dizilerinin Kültüre Alınması

Hücre kültürü işlemleri steril kabin içinde gerçekleştirilmiş ve her çalışmadan 30 ile 45 dakika önce laboratuvar ortamı ve kabin içi ultraviyole lamba yardımı ile steril edilmiştir. Hücreler, %1 Penisilin-Streptomisin, %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde yirmi beş cm^2'lik özel hücre kültürü kaplarında çoğaltılmıştır.

3.3. Hücre Dizilerinin Pasajlanması

Hücrelerin yoğunluğu kültür kabının %70-80'ini kapladığında kültür kabındaki sıvı besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin tabandan ayrılması için Tripsin-EDTA solüsyonu ortama ilave edilmiş ve 5 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra hücreler, mikroskop altında kontrol edilmiş ve içerisinde 9 mL besiyeri olan eppendorf tüpüne konularak 1200 devir/dakika 10 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Süpernatantın tamamı döküldükten sonra, 1-2 mL besiyeri eklenerek dipte kalan hücreler pipet yardımıyla homojen hale getirilmiş, 10 mL besiyeri içeren 75 cm^2'lik kültür kaplarına konularak çoğalmaları için tekrar inkübatöre kaldırılmıştır.

Kültür kaplarındaki hücreler, ters ışık mikroskobu kullanılarak canlılık, çoğalma ve kontaminasyon bakımından günlük olarak takip edilmiş ve iki günde bir besi yerleri yenilenmiştir.

3.4. Hücrelerin Sayımı

Deneye alınacak hücrelerin sayımında canlı hücre ile ölü hücreleri ayırt etmekte kullanılan bir boyama yöntemi olan tripan mavisi tercih edilmiştir. Bu boyama yönteminde ölü hücreler hücre zarı bütünlüğünü kaybettiği için tripan mavisi boyasını içlerine kontrolsüz olarak alırlar. Fakat canlı hücrelerin hücre zarları sağlam olduğu için boyayı içlerine almamaları nedeniyle boyanmazlar.Hücre sayım cihazı canlı hücrelerin sayımı amacıyla kullanılmıştır.

3.5. Hücrelerin Ekilmesi ve İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan borotungstat için 10 mM'lık, ana stok hazırlanmış, madde saf su ile çözülmüştür. Deneyde kullanılacak olan konsantrasyonlar ise DMEM besiyeri kullanılarak elde edilmiştir (Çizelge 3.1).

Canlı hücre sayımı sonunda, kültür kaplarının her bir kuyucuğuna $1x10^4$ hücre olacak şekilde 100 µL hacim içinde ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saatlik süre ile inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 100 µL hacim içinde olacak şekilde konsantrasyonlar kuyucuklara eklenmiştir

Negatif kontrol grubu olarak borotungstat içermeyen kuyulara sadece 100 µL besiyeri konmuştur.

Çizelge 3.1. Borotungstat konsantrasyonları

Sıra	Borotungstat Konsantrasyonları
1	Kontrol
2	10 µM Borotungstat
3	25 µM Borotungstat
4	50 µM Borotungstat
5	75 µM Borotungstat
6	100 µM Borotungstat

Çalışmada pozitif kontrol olarak toz halde bulunan karboplatin (Carbodex) kullanılmıştır. Karboplatin 10 mM'lık ana stok olacak şekilde saf su ile çözülerek hazırlanmıştır. Deneylerde DMEM içerisinde seyreltilen 10, 25, 50, 75 ve 100 µM'lık karboplatin dozları uygulanmıştır (Çizelge 3.2).

Hazırlanan dozlar kuyucuklara 100 µL hacim içinde olacak şekilde 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. İlaç içermeyen kuyucuklara sadece 100 µL besiyeri konularak kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için 8 kuyu kullanılmış ve her bir deney birbirinden bağımsız üç kez denenmiştir.

Çizelge 3.2. Karboplatin Dozları

Sıra	Karboplatin Dozları
1	Kontrol
3	10 µM Karboplatin
4	25 µM Karboplatin
5	50 µM Karboplatin
6	75 µM Karboplatin
7	100 µM Karboplatin

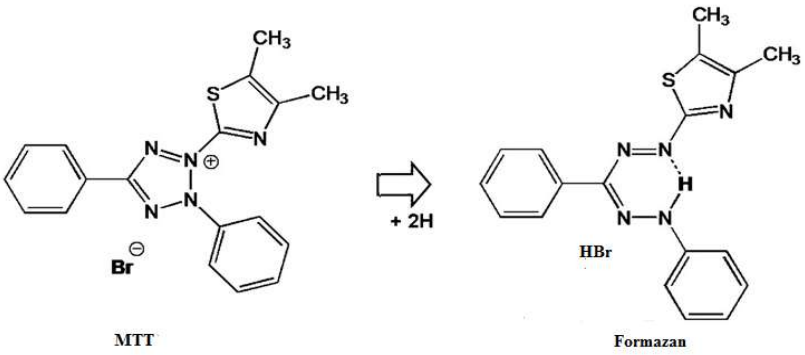
3.6. Hücrelerin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Borotungstat konsantrasyonları ile muamele edilen A549 ve H460 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak gözlemlenen morfolojik değişiklikler inverted mikroskop (Nikon Eclipse, TC100) yardımıyla incelenmiştir. Görüntüleme Kameram 21 programı ile görüntülenmiştir.

3.7. MTT Analizi ile Sitotoksik Aktivitenin Araştırılması

Borotungstat ile karboplatin konsantrasyonlarının A549 ve H460 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. Mossmann tarafından tanımlanıp ve Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen (Mossman, 1983; Alley vd., 1988) bu yöntemde mitokondriyal aktivitesi yüksek ve hızlı çoğalan hücre dizileri sıklıkla tercih edilmektedir.

MTT, hücrelere aktif olarak alınabilen ve mitokondriye bağlı bir dizi reaksiyonla mor renkli, suda çözülmeyen formazana indirgenebilen bir boyadır. Hücrede boyanın tetrazolium halkası, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile parçalandığında, sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor suda çözülmeyen formazana dönüşmektedir (Şekil 3.1). Formazan hücre zarını geçemediği için hücrenin içinde toplanır. Bu yöntemde hücrelerin MTT boyasını indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınmaktadır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki boyanın yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı göstermektedir (Meerloo vd., 2011; Kısmalı ve Sel, 2012).



Şekil 3.1. Mitokondride MTT boyasının formazana indirgenme reaksiyonu (Stockert vd., 2012)

Her deneyden önce taze olarak hazırlanan MTT (5 mg/mL), muamele süreleri bittiğinde kültür kaplarındaki kuyucuklara 20 µL olacak şekilde eklenmiştir. Ardından kültür kapları 37 °C'de %5 CO_2'li ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. Muamele sonunda kültür kaplarının içeriği alınmıştır.Ardından kuyulara 100 µL DMSO solüsyonu eklenmiştir. Ölçümler mikroplaka okuyucu (Bio-Tek, Powerwawe XS) ile 550 nm dalga boyunda yapılmıştır. Hücre canlılığı için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Oztopcu-Vatan vd., 2015).

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)}: \frac{\text{İlaç verilen her bir kuyucuktaki hücre absorbansı x100}}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

Deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kere yapılmış ve elde edilen veriler SPSS programında önce tek yönlü varyans analizi ANOVA ile incelenmiştir. Daha sonra verilerin analizi Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle değerlendirilmiştir. $p<0,05$, anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir. Ayrıca istatistiksel değerlendirmesi yapılmış olan verilerin grafiklerinde anlamlılıklar (*) işareti ile gösterilerilerek, Microsoft Excel (Office 2015) programı kullanılarak çizilmiştir.

3.8. Borotungstat ve Karboplatin Konsantrasyonlarının Kombine Olarak Uygulanması

Karboplatin akciğer kanseri tanısı konulan hastaların kemoterapisinde sıklıkla tercih edilen bir kemoterapötik bir ajandır. Çalışmada her iki hücre dizisinde de, borotungstat konsantrasyonları ile birlikte 1:1 oranında kombine olarak uygulanan karboplatin dozlarının antagonistik/sinerjistik etkileşimleri doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Kontrol grubunun absorbans değerine göre kuyucuklardaki absorbans değerlerinin yüzdesi '' Sitotoksisite (%) = Doz grubunun absorbansı x100 / Kontrol grubunun absorbansı'' formülüne göre hesaplanmıştır. Deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kere yapılmış ve elde edilen veriler SPSS programında önce tek yönlü varyans analizi ANOVA ile incelenmiştir. Daha sonra verilerin analizi Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle değerlendirilmiştir. $p<0,05$, anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir. Ayrıca istatistiksel değerlendirmesi yapılmış olan verilerin grafiklerinde anlamlılıklar (*) işareti ile gösterilerilerek, Microsoft Excel (Office 2015) programı kullanılarak çizilmiştir.

Borotungstat ve karboplatin arasındaki sinerjistik/antagonistik etkileşim 'İlaç etkileşimi katsayısı = (Kombine doz absorbansı / borotungstat absorbansı x karboplatin absorbansı) x 100' formülüne göre belirlenmiştir. İlaç etkileşimi katsayısı <1 için sinerjistik etkileşim, İlaç etkileşimi katsayısı >1 için antagonistik etkileşim olduğu ifade edilmiştir (Daphu vd., 2014).

3.9. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Çalışılan hücrelerdeki, DNA fragmentasyonunun tespit edilmesi amacıyla Roche firması tarafından üretilen Hücre Ölümü Belirleme Kiti denenmiştir.

Deneylerde, her iki hücre dizisi 24 saat süre ile MTT yönteminden elde edilen verilere göre seçilen borotungstat konsantrasyonlarına ile maruz bırakılmıştır. Tüm işlemler sırasıyla kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyuda, A549 ve H460 hücreleri $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat süre inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda ekim yapılan kaplar 10 dakika, 27 °C, 200 g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatantın tamamı eppendorf tüplere alınmıştır (Nekroz için).

Süpernatantı alınan her bir kuyuya 200 µL lizis tamponu eklenmiş ve otuz dakika oda sıcaklığında, karanlık ortamda, apoptotik etkinin araştırılması için bekletilmiştir. Süre sonunda tekrar kültür kapları 10 dakika 27 °C, 200 g'de santrüfüj edilmiştir. Ardından seçilen kuyulardan (nekroz için süpernatant, apoptoz için ise hücre lizatı) 20 µL alınarak streptavidin kaplı kuyulara aktarılmıştır. Daha sonra bu kuyuların üzerine; 80 µL immünoreagent eklenerek oda sıcaklığında, 2 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon amacı anti-histon biotin antikorunun nükleozom üzerinde bulunan histon proteinlere ve kuyularda streptavidine bağlanmasını sağlamaktır. Anti-DNA pod antikoru ise bu işlem esnasında nükleozomlarda bulunan DNA'ya bağlanmaktır. İnkübasyon süresinin bitmesiyle yıkama yapılmış sonra her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan ABTS solüsyonundan 100 µL eklenip renk değişimi gözleninceye kadar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. ABTS solüsyonu bir önceki basamakta eklenen anti-DNA pod antikoru ile reaksiyona girerek renk vermektedir.

Reaksiyonu durdurmak için ABTS stop solüsyonu 100 µL olacak şekilde kuyulara eklenmişve bu sayede reaksiyon durdurulmuştur. Son aşama olarak her bir kuyudaki absorbans değerleri mikroplaka okuyucu cihazı ile 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Çalışmada kitte bulunan pozitif kontrol kullanılmıştır. Pozitif kontrole göre nükleozomal DNA parçalanma oranı %100 kabul edilmiş ve seçilen borotungstat dozlarının hücrelerdeki DNA parçalanma oranları belirlenen zenginleştirme faktörü (enrichment) formüle göre hesaplanmıştır. (Yildiz-Ozer vd., 2018).

Zenginleştirme Faktörü (Enrichment) Faktörü: (Doz-Kör)/ (Kontrol-Kör)

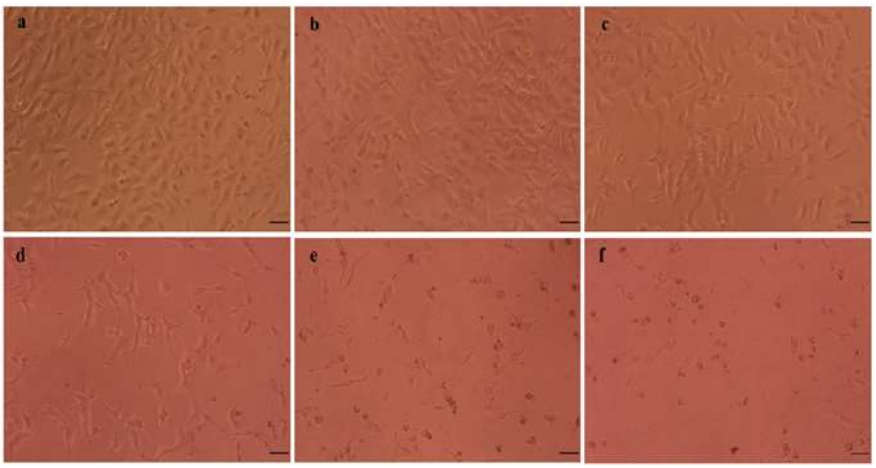
Elde edilen veriler istatistiksel olarak, Graphpad Prism 6 programında Student t testi ile analiz edilmiştir. *: $p<0,05$, anlamlılık düzeyi olarak olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Borotungstatın A549 ve H460 Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

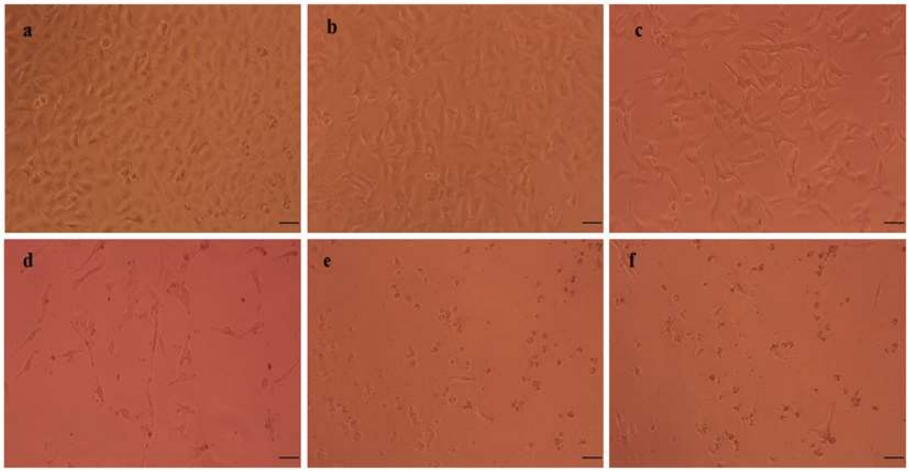
Çalışmada uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının insan epitelyal akciğer adenokarsinomu (A549) ve insan büyük hücreli akciğer karsinomu (H460) hücreleri üzerindeki zamana bağlı olarak oluşan morfolojik değişiklikleri inverted mikroskop ile görüntülenmiştir.

A549 hücre dizisinde, 24 saat süre ile denenen 10 µM borotungstat konsantrasyonunun hücre morfolojisinde değişik oluşturmadığı belirlenmiştir Morfolojik değişikliklerin 25 µM konsantrasyonundan itibaren gözlendiği belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça Hücresel morfolojinin değiştiği, sayıca azaldığı kontrol grubu ile kıyaslandığında belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin hacimce küçüldüğü ve klasik mekik şeklinin bozulup, yuvarlaklaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.1).



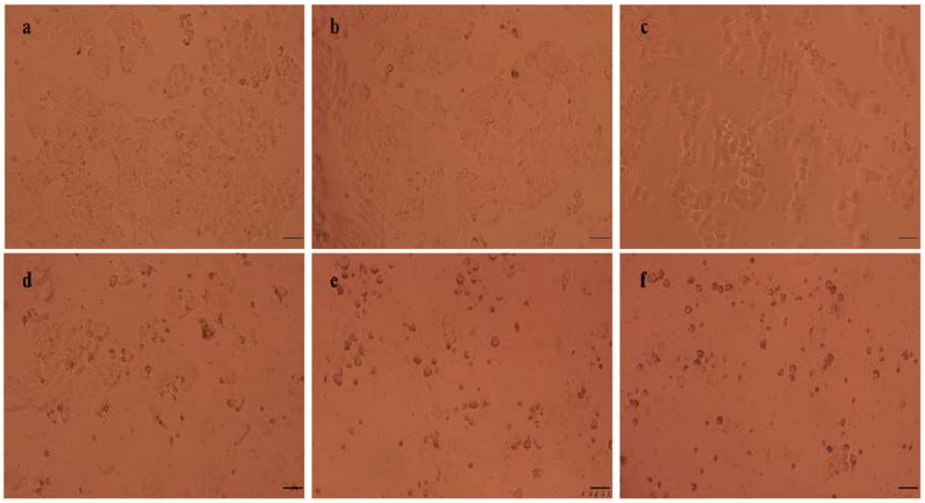
Şekil 4.1. 24 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının A549 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi (a: kontrol; b: 10 µM; c: 25 µM; d: 50 µM; e: 75 µM; f:100 µM).

A549 hücrelerinde, 48 saat süre ile denenen borotungstat konsantrasyonlarında ise morfolojik değişikliklerin en düşük doz olan 10 µM konsantrasyonunda başladığı belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça morfolojik değişiklikler daha da belirginleşmiştir (Şekil 4.2).



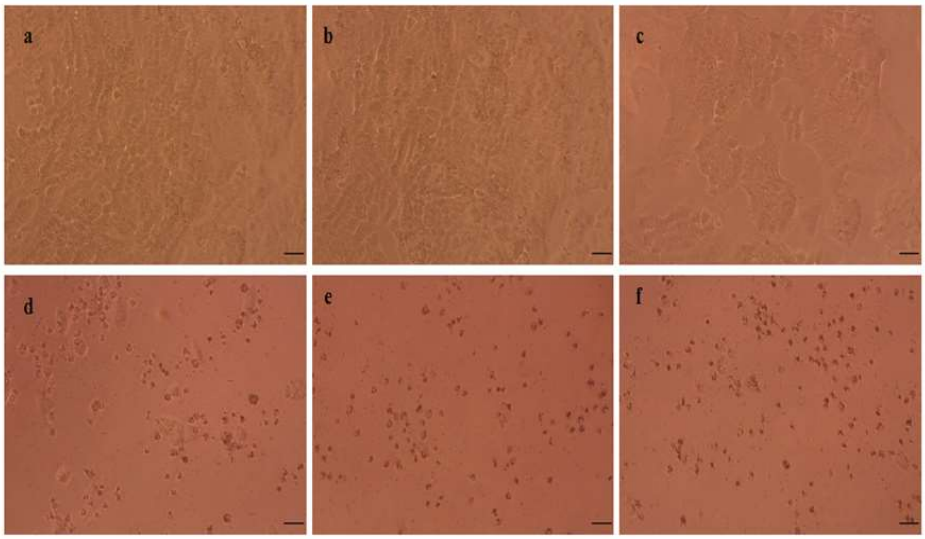
Şekil 4.2. 48 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının A549 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi (a: kontrol; b: 10 µM; c: 25 µM; d: 50 µM; e: 75 µM; f: 100 µM).

H460 hücre dizisinde 24 saat süre ile denenen 10 µM borotungstat konsantrasyonunun her hangi bir hücre morfolojisinde değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Hücre morfolojisi üzerindeki değişikliklerin 25 µM konsantrasyonundan itibaren hücre morfolojisi üzerinde değişikliğe neden olduğu gözlenmiştir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda hücre sayısında ciddi bir azalma olduğu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 24 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının H460 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi (a: kontrol; b: 10 µM; c: 25 µM; d: 50 µM; e: 75 µM; f: 100 µM)

H460 hücre dizisinde 48 saat süre ile denenen 10 µM borotungstat konsantrasyonunun 24 saatte olduğu gibi hücre morfolojisinde her hangi bir etki göstermediği tespit edilmiştir. 25 µM konsantrasyonundan itibaren özellikle yüksek konsantrasyonlarda bir arada kümeler oluşturan H460 hücrelerinin birbirinden ayrıldığı ve kümeleşmenin tamamen yok olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda hücre sayısında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Borotungstat maddesinin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmıştır.



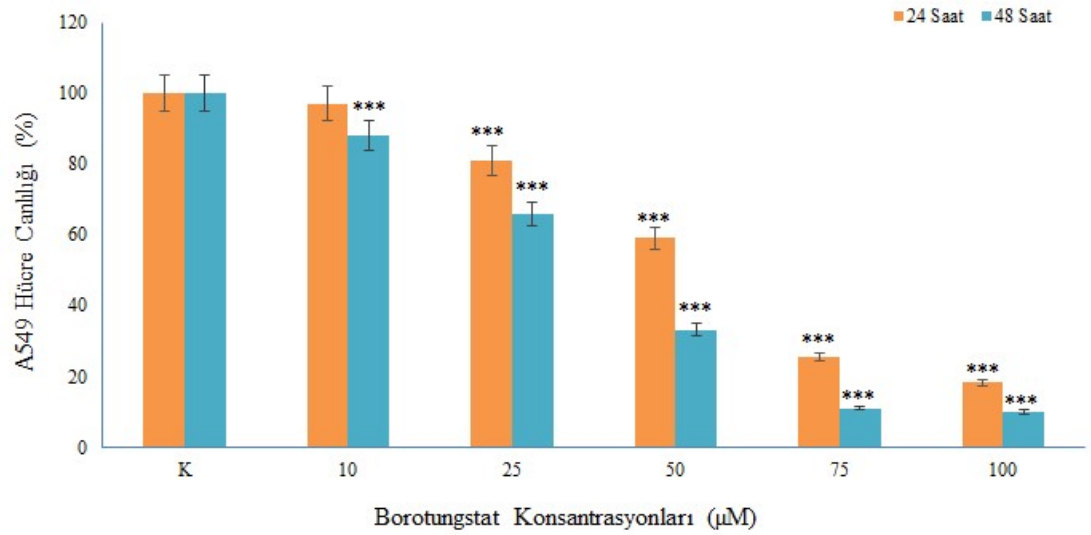
Şekil 4.4. 48 saat süre ile uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının H460 hücrelerindeki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi (a: kontrol; b: 10 µM; c: 25 µM; d: 50 µM; e: 75 µM; f:100 µM)

4.2. Borotungstatın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Çalışmada A549 ve H460 hücre dizilerine 10, 25, 50, 75 ve 100 µM borotungstat konsantrasyonları 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır.

A549 hücre dizisinde 24 saat süre ile denenen 10 µM borotungstat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde her hangi bir sitotoksik etkisi görülmezken ($p>0,05$); diğer konsantrasyonların sırasıyla % 80, 59, 37 ve 18 oranında hücre canlılığını azalttığı kontrol grubu ile kıyaslandığında tespit edilmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.5). 24 saat için IC_{50} değeri 60 µM olarak belirlenmiştir.

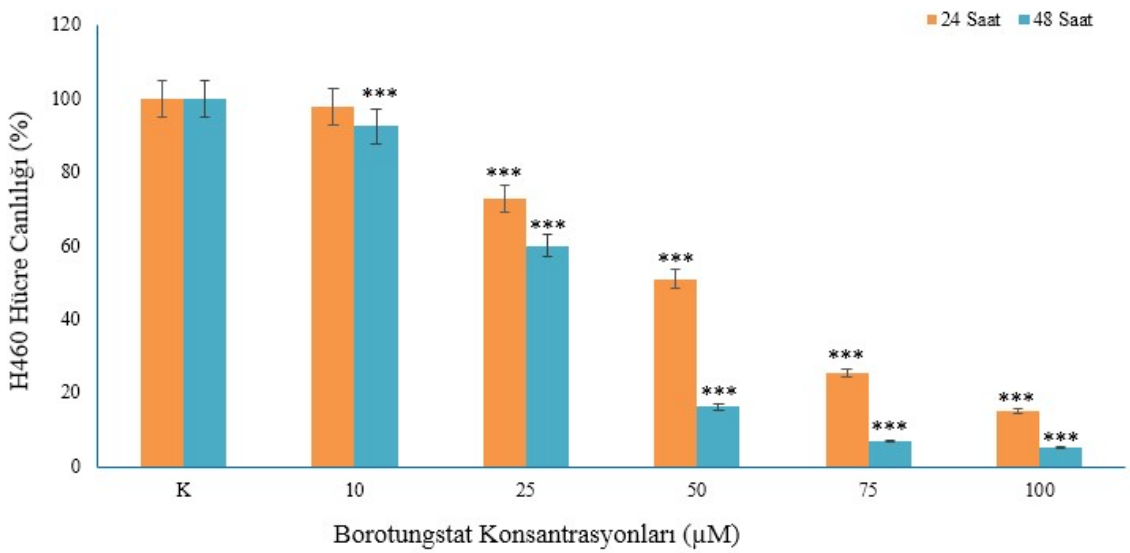
48 saat süre ile denenen borotungstat konsantrasyonlarının % 88 66, 33, 10 ve 9 oranında ($p<0,001$; Şekil 4.5) hücre yaşam oranında azalmaya neden olduğu kontrol grubu ile kıyaslandığında belirlenmiştir. 48 saat için 37 µM IC_{50} değeri belirlenmiştir.



Şekil 4.5. A549 hücreleri üzerindeki borotungstat konsantrasyonların sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi (***: $p<0,001$).

Denenen borotungstat konsantrasyonlarının H460 hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisi 25 µM konsantrasyonundan itibaren başlamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında sırasıyla % 73, 50, 25 ve 15 oranında azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.6). IC_{50} değeri ise 24 saat için 51 µM olarak hesaplanmıştır.

Çoğalmayı baskılayıcı etkinin 48 saatlik uygulama sonucunda da 25 µM borotungstat dozundan itibaren başladığı ve hücre canlılığının sırasıyla % 59, 16, 6 ve 5 oranında azaldığı hesaplanmıştır ($p<0,001$; Şekil 4.6). IC_{50} değeri 48 saat için 31 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. H460 hücreleri üzerindeki borotungstat konsantrasyonların sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi (***: p<0,001).

Borotungstatın yeni sentezlenen ve akciğer kanseri üzerinde ilk defa denenen bir polioksometalat bileşiği olması nedeniyle bu bileşikle ilgili yapılan herhangi bir sitotoksisite çalışması bulunmamaktadır. Ancak farklı polioksometalat bileşiklerinin çeşitli kanserli hücre dizileri üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin;

Zhang ve vd, demir hepta-tungsten fosfat oksijen kümesi (IHTPO) adı verilen bir polioksometalat bileşiğinin; karaciğer (HepG2), lösemi (K562), küçük hücreli dışı akciğer (A549 ve NCI-H460) hücreleri ve S180 sarkoma hücreli fareler üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT yöntemini kullanarak araştırmışlardır. IHTPO adı verilen polioksometalat bileşiğinin; IC_{50} değeri A549 için, 150,24 ± 4.15 µM, H460 için 141,48 ± 2.42 µM, HepG2 için 63.78 ± 0.16 µM, K562 için 114,55 ± 1.49 µM olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2015).

Yapılan bir diğer çalışmada sentezlenen organik-inorganik hibrid borotungstat bileşiği ‘bileşik 1’ olarak adlandırılmıştır. Çalışmada adı geçen borotungstat bileşiği formül olarak bu tez de kullanılan bileşikten tamamen farklıdır. Bileşik 1’in MTT metodu kullanılarak küçük

hücreli dışı akciğer kanseri (PG49), insan kemik osteosarkoması (HOS) ve epitelyal ductal adenokarsinoması (PL45) hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkinliği belirlenmiştir. Test edilen bileşiğin sitotoksisitenin potansiyelini karşılaştırmak için karboplatin pozitif kontrol olarak uygulanmıştır. Deneysel sonuçlar, bileşik 1'in, üç farklı kanser hücre dizisinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Test edilen Bileşik 1' in IC_{50} değerleri sırasıyla 45.77µg/mL (PG49), 54.34 µg/mL (PL45), 66.12 µg / mL (HOS) olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada Bileşik1 karboplatine göre daha güçlü bir antitumor aktivite gösterdiği belirlenmiştir. (Yu, 2017).

Li vd., tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise, sentezlenen 4 farklı polioksometalat bileşiğinin, meme (MCF-7), rahim ağzı (HeLa) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (A549) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenmesinde MTT yöntemi kullanılmış ve 24 saatin sonunda A549 hücrelerinde 0.042-1.213 µmol aralığında IC_{50} sonuçları elde edilmiştir (Li vd., 2019).

Yapılan farklı çalışmalarda da farklı borotungustat bileşiklerinin kanserli hücre dizilerinin çoğalması üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Fakat bu etkilerin farklı kanser hücrelerinde farklı şekilde etki ettiği görülmektedir. Aynı şekilde sentezlenen maddelerin yapısal değişiklikleri de bu toksik etki üzerinde farklılıklar oluşmasına neden olabilmektedir. Bizim denediğimiz borotungstat bileşiğide her iki hücre dizisinde benzer şekilde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

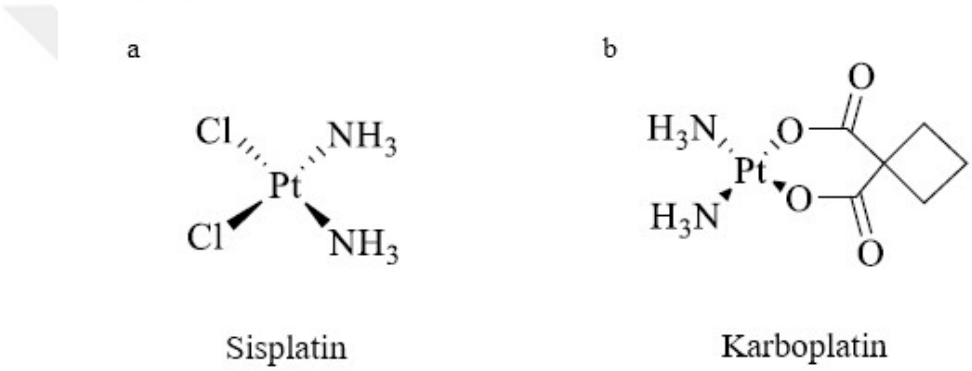
4.3. Karboplatinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Sisplatin (cis-diamin-dikloroplatin (II)) ve sisplatinin analoğu olan diğer platin temelli moleküller (karboplatin, oksaliplatin, satraplatin); jinekolojik, baş boyun, akciğer ve mesane kanseri gibi pek çok kanser türünde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlardır (Ho vd., 2016).

Sisplatin kullanılan hastalarda bulantı, böbrek fonksiyonlarında bozulma, nörotoksisite ve ototoksisite gibi yan etkiler sıklıkla görülmektedir (Ho vd., 2016). Bu nedenle araştırmacılar

yan etkisi daha az olabilecek platin türevlerini araştırmaktadır. Bu araştırmalar sonucunda karboplatin elde edilmiştir.

Karboplatin (cis-diamin-siklobütandikarboksilat-platin (II)), terapötik etkinliği sisplatin ile oldukça benzer olmakla birlikte, çok daha düşük seviyede nefrotoksisite ve nörotoksisiteye yol açan bir ajandır. Bu özellikleri nedeniyle karboplatin, küçük hücreli akciğer kanseri başta olmak üzere farklı kanserlerin de tedavisinde tercih edilen bir kemotöropotik bir ajandır (Ho vd., 2016).



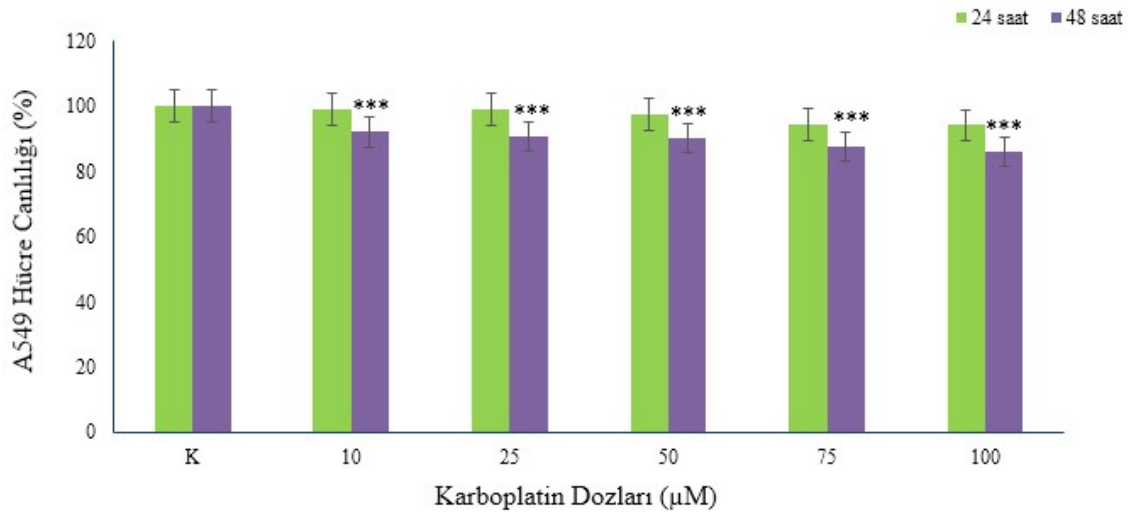
Şekil.4.7. Sisplatin (a) ve karboplatinin (b) kimyasal yapısı (Aktaş, 2019)

Çalışmamızda karboplatin pozitif kontrol olarak tercih edilmiştir. Karboplatin'in küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesinde mitokondriyal aktiviteye dayalı kantitatif ölçüm yapılmasını sağlayan MTT yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda A549 ve H460 hücrelerine borotungstat konsantrasyonları ile aynı olacak şekilde 10, 25, 50, 75 ve 100 µM karboplatin dozları 1:1 oranında 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır.

Yapılan deneylerin sonucunda A549 hücrelerinde, karboplatin dozlarının 24 saatlik uygulaması sonucunda hücre canlılığı üzerinde çoğalmayı baskılayıcı her hangi bir etki göstermediği belirlenmiştir (p>0, 05; Şekil 4.8).

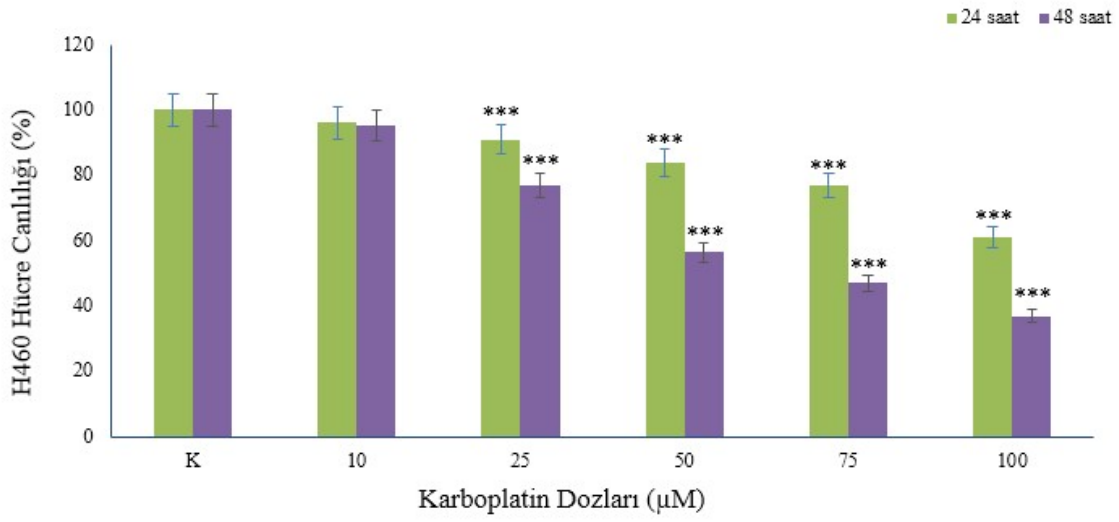
Karboplatinin A549 hücreleri ile 48 saat muamelesi sonucunda ise 10 ve 25 µM dozlarında çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermezken (p>0,05), 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre yaşam oranını sırasıyla yaklaşık % 10, 13 ve 15 oranında baskıladığı tespit edilmiştir (***: p<0,001; Şekil 4.8). Hem 24 hem de 48 saat süre ile denenen karboplatin dozları için her hangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.8. A549 hücreleri üzerindeki karboplatin dozlarının sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi (***: p<0,001).

H460 hücreleri ile 24 saat karboplatin uygulamasında 10 µM dozunda hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki gözlenmemesine rağmen (p>0,05), 25 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre yaşam oranı kontrole göre sırasıyla yaklaşık % 9, 16, 23 ve 39 oranında azalttığı görülmüştür (p<0,001; Şekil 4.9).

H460 hücreleri ile 48 saatlik uygulama sonucunda ise 10 µM dozunda hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki gözlenmemesine rağmen ($p > 0,05$), 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre yaşam oranı kontrole göre sırasıyla yaklaşık % 23, 44, 53 ve 63 oranında azaldığı tespit edilmiştir (***: $p<0,001$ Şekil 4.9). IC_{50} değeri 24 saat için bulunamazken, 48 saat için 55 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9.H460 hücreleri üzerindeki karboplatin dozlarının sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi (***: $p<0,001$).

Akciğer kanseri hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarda karboplatin sıklıkla pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Böylece, yeni araştırılan maddelerin hücre çoğalmasını baskılayıcı ve sitotoksik etkileri aktif olarak tedavide kullanılan bir ilaç ile karşılaştırılmaktadır.

Liu vd., tarafından tasarlanan bir çalışmada A549 hücre dizisi üzerindeki 48 saatlik karboplatin dozlarının uygulanması sonucunda IC_{50} değeri 141 µM olarak bulunmuştur (Liu vd., 2013).

Zhou vd., tarafından yapılan bir diğer çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan karboplatin A549 ve H460 hücre dizileri üzerinde denenmiştir. Hücre canlılığı, MTS (3- (4,5-

dimetiltiyazol-2-il) -5- (3 karboksimetoksifenil) -2- (4-sülffenil) -2H-tetrazolyum) metodu ile değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre 24 saatteki A549 IC_{50} değeri 41 µM, H460 IC_{50} değeri ise 85 µM olarak bulunmuştur (Zhou vd., 2010).

Wang vd., tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri çeşitlerinden A549 ve H460 hücre dizileri üzerinde karboplatin farklı bir bileşik ile kombine tedavi de denenmek istenmiştir. Bununla ilgili olarak karboplatinin 72 saatlik tek başına doz uygulamasında hücre canlılığı MTS metodu ile hesaplanmıştır. Sonuçlara göre A549 IC_{50} değeri 280 µM iken, H460 IC_{50} değeri 132 µM olarak bulunmuştur (Wang vd., 2018).

Karboplatin dozlarının 72 saatlik uygulama süresince, A549 hücre dizileri üzerindeki hücre canlılığını tespit etmeyi amaçlayan farklı bir çalışmada karboplatinin IC_{50} değeri 72 µM olarak hesaplanmıştır (Ye vd., 2009). 2010 yılında aynı grupla yapılan çalışma da ise karboplatin IC_{50} değeri 69 µM olarak hesaplanmıştır (Ye vd., 2010).

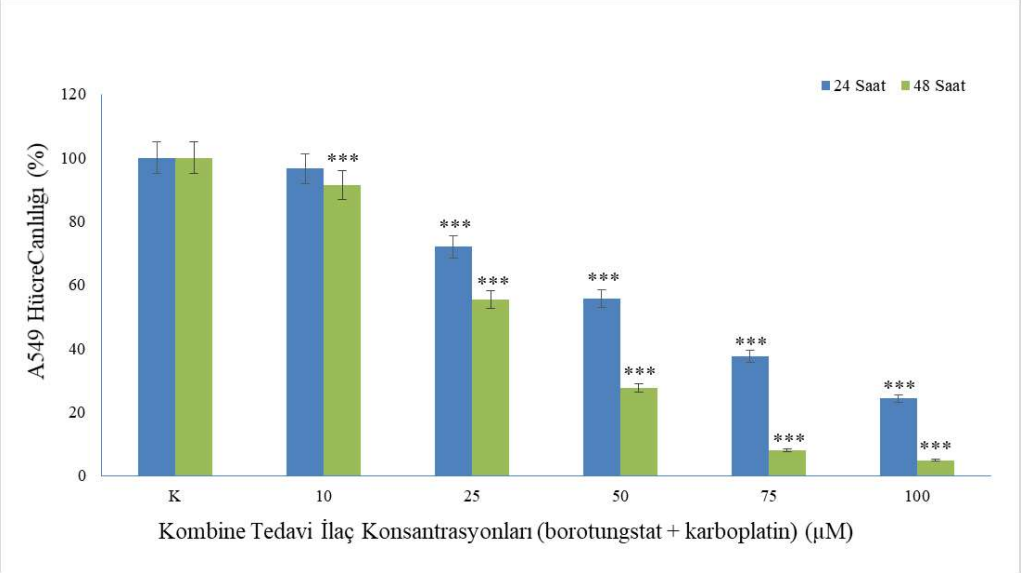
IC_{50} değerleri arasındaki farklılıkların uygulama süreleri, deney koşulları ve hücre sayılarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Borotungstat ve karboplatin uygulaması sonuçları karşılaştırıldığında her iki hücre dizisinde de borotungstat konsantrasyonlarının karboplatine göre daha düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiği ve hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir.

4.4. Borotungstat ve Karboplatin Konsantrasyonlarının Kombine Olarak Uygulanması

Bu çalışma için borotungstat ve karboplatinin aynı konsantrasyonlardaki miktarları 1:1 oranında birleştirilerek 10, 25, 50, 75 ve 100 µM kombine (borotungstat + karboplatin) konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her iki hücre dizisinde belirlenen konsantrasyonlar ile 24 ve 48 saat süre boyunca muamele edilmiş ve sonuçlar MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Borotungstat ve karboplatinin antagonistik/sinerjistik etkileşimleri ilaç etkileşimi kat sayıları CDI= (Kombine konsantrasyon absorbansı/ borotungstat absorbansı x karboplatin absorbansı) x 100 formülüyle hesaplanarak belirlenmiştir.

Kombine tedavinin A549 hücrelerinde 24 saat süre boyunca uygulanması sonucunda 10 µM (borotungstat + karboplatin) konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde çoğalmayı baskılayıcı her hangi bir etkisi gözlenmezken ($p>0,05$), diğer kombine verilen dozların hücre canlılığında sırasıyla % 28, 44, 63 ve 76 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri 58 µM olarak hesaplanmıştır.

Kombine tedavinin 48 saat uygulanması sonucunda ise hücre canlılığında sırasıyla % 9, 45, 72, 92 ve 95 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri 48 saat için 29 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. A549 hücrelerinde 24 ve 48 saat süre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi (***: $p<0,001$).

A549 hücre dizisinde ilaç etkileşimi katsayısı formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda 24 saatte, karboplatin ve borotungstat arasında, 10, 25, 50 µM dozlarında sinerjistik bir etki meydana gelirken, 75 ve 100 µM dozlarında antagonistik bir etkileşim oluşmuştur.

48 saatte ise 10 µM dozunda antagonistik bir etki görülürken 25 µM dozundan itibaren sinerjistik bir etkileşim meydana gelmiştir (sinerjistik etki: CDI<1, antagonistik etki CDI>1) (Çizelge 4.1).

	A549 24 Saat			
	Borotungstat	Karboplatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
10 µM	97,19	99,07	94,16	0,97
25 µM	80,61	99,07	71,95	0,9
50 µM	59,12	97,4	55,71	0,96
75 µM	37,01	94,3	37,56	1,07
100 µM	18,32	94,1	24,28	1,4

	A549 48 Saat			
	Borotungstat	Karbolatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
10 µM	88,17	92,1	91,3	1,12
25 µM	66,1	90,7	55,4	0,92
50 µM	33,35	90,1	27,6	0,91
75 µM	10,8	87,6	7,9	0,83
100 µM	9,84	85,9	4,9	0,57

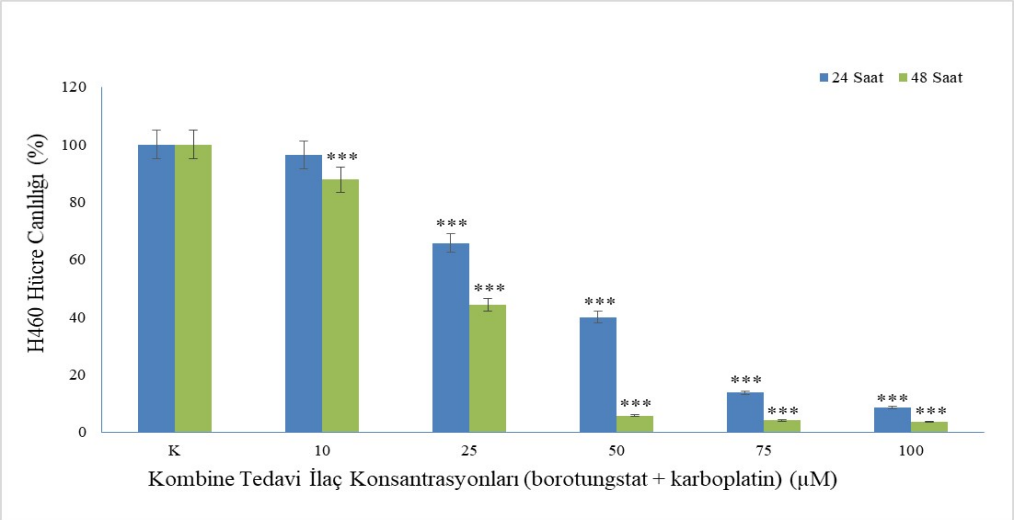
***CDI=(Kombine/Borotungstat x Karbolatin) x 100**

Çizelge 4.1. A549 hücrelerinde borotungstat ile karboplatinin kombine tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik canlılık oranları (%). CDI: İlaç etkileşimi katsayısı.

Kombine tedavinin H460 hücrelerinde 24 saat süre boyunca uygulanması sonucunda 10 µM (borotungstat + karboplatin) konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde çoğalmayı baskılayıcı her hangi bir etkisi gözlenmemiştir ($p>0,05$). Diğer kombine verilen konsantrasyonların hücre canlılığında sırasıyla % 24, 60, 63, 86 ve 91 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri 40 µM olarak hesaplanmıştır.

Kombine tedavinin 48 saat uygulanması sonucunda ise hücre canlılığında sırasıyla % 9, 45, 72, 92 ve 95 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri 23 µM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Bu sonuçlara göre borotungstat karboplatin ile kombine olarak uygulandığında borotungstatın etkinliğini belirgin ölçüde azaltmış olup H460 hücrelerinin canlılığı üzerinde daha toksik olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.11. H460 hücrelerinde 24 ve 48 saat süre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi (***: p<0,001).

H460 hücre dizisinde yapılan hesaplama sonucunda 24 saatte karboplatin ve borotungstat arasında yalnızca 10 µM dozunda antogonistik bir etki görülürken 25 µM dozundan itibaren sinerjistik bir etkileşim görülmüştür. 48 saatte 10, 25 ve 50 µM dozlarında sinerjistik bir etki görülürken 75 ve 100 µM dozlarında antogonistik etki meydana gelmiştir (Çizelge 4.2).

	H460 24 Saat			
	Borotungstat	Karboplatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
10 µM	92,5	96,1	96,4	1,08
25 µM	73,01	91	65,7	0,98
50 µM	50,72	83,9	40	0,93
75 µM	25,52	76,9	13,7	0,69
100 µM	15,2	68	8,7	0,08

	H460 48 Saat			
	Borotungstat	Karbolatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
10 µM	97,7	95,3	87,82	0,94
25 µM	59,8	76,6	44,25	0,96
50 µM	16,36	56,4	5,77	0,62
75 µM	6,09	46,6	4,07	1,43
100 µM	5,11	36,7	3,55	1,89

*CDI=(Kombine/Borotungstat x Karbolatin) x 100

Çizelge 4.2. H460 hücrelerinde borotungstat ile karboplatinin kombine tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik uygulamaları CDI: İlaç etkileşimi katsayısı.

Çalışmada A549 hücre dizisinde 24 saatte 10, 25 ve 50 µM borotungstat ile karboplatinin birlikte çalıştığı gözlenirken diğer konsantrasyonlarda antogonistik bir etki gözlenmiştir. Bununla beraber 48 saatte 25 µM'dan itibaren kombine denen tüm dozlarda sinerjistik bir etki gözlenmiştir. H460 hücre dizisinde ise 25 µM'dan itibaren denenen tüm kombine uygulamalarda özellikle doz artışına bağlı olarak sinerjistik etkide artış gözlenmiştir. Özellikle 75 ve 100 µM uygulamalarında borotungstat ile karboplatin güçlü bir sinerjistik etki göstermiştir. Fakat 48 saatte doz artışına bağlı olarak böyle bir etkiden bahsetmek mümkün değildir. 75 ve 100 µM uygulamasında etkinin antogonistik etkiye dönüştüğü, 10, 25 ve 50 µM uygulamalarında,ise olduğu görülmektedir.

Çalışmada H460 ile A549 hücre dizileri ilaç etkileşimi bakımından karşılaştırıldığında 24 saatte H460 hücrelerinde denen borotungustat + karboplatin uygulamasının doz artışına bağlı olarak A549 hücrelerine göre daha fazla sitotoksisiteye neden olduğu tespit edilmiştir.

Borotungstat + karboplatin uygulamasının özellikle 24 saatte büyük hücreli karsinom çeşidi olan H460 hücre dizisi üzerinde daha fazla sitotoksik aktiviteye neden olduğu ve doz artışına bağlı olarak bu sinerjistik etkinin artığı tespit edilmiştir. Benzer etki A549 hücre dizisinde de gözlenmiş olmakla beraber bu sinerjistik etkinin daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Aynı kanser tipinin farklı türleri arasında bile ilaç etkileşimleri değişkenlik gösterebildiği çalışmamız ile ortaya konmuştur. Farklı akciğer kanseri hücre dizileri ile borotungstat ile karboplatin kombine uygulamaları yapılabilir. Çalışmamızda 1:1 oranında uygulanan kombine farklı şekillerde de (1:2, 1:3 vb.) denenebilir. Ayrıca akciğer kanserinde uygulanan farklı kemoterapötik ajanlar ile borotungstat konsantrasyonlarının ilaç etkileşimleri de farklı çalışmaların konusu olabilir.

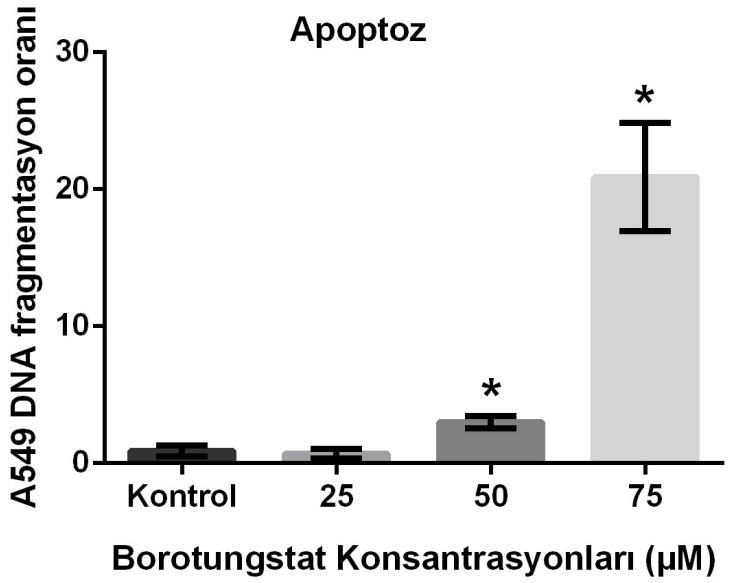
Normal ya da kanserli hücrelerde herhangi bir kemoterapötik bir ajanla borotungstatın birlikte verilerek yarattığı sinerjistik/antogonistik etkinin araştırılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Benzer şekilde sentez edilen herhangi bir polioksometalat bileşiği ile ilgili böyle bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda ilk kez iki farklı akciğer kanseri hücresi kullanılarak borotungstat ile karboplatin arasındaki sinerjistik/antogonistik etkileşim doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır.

4.5. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Sitotoksisite verilerine göre seçilen 25, 50 ve 75 µM borotungstat konsantrasyonları uygulanan A549 ve H460 hücrelerinde ki apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümünü kantitatif olarak belirlemek amacıyla Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti (Roche) kullanılmıştır.

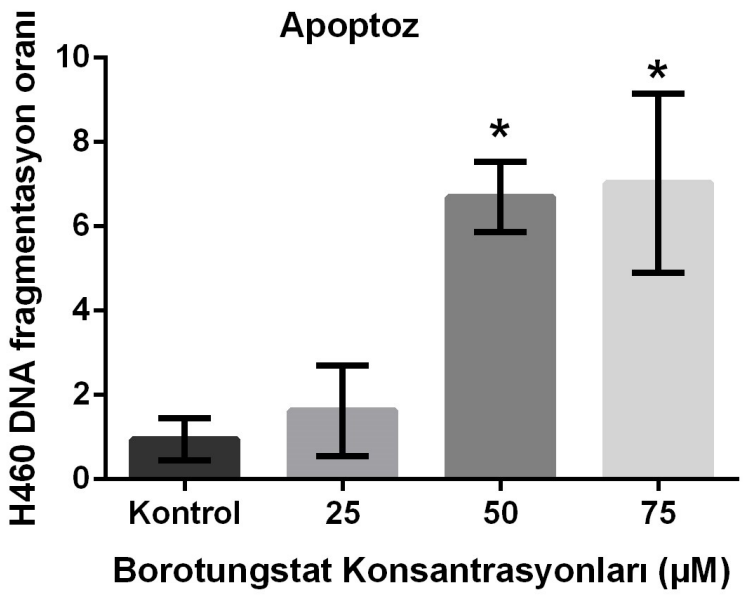
Seçilen konsantrasyonlarla hücreler 24 saat süre ile muamele edilmiş olup, apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümü oranları kit protokolünde belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinin zenginleştirme faktörü 1 (EFK:1) olarak kabul edilmiştir.

A549 hücre dizisinde denenen 25 µM borotungstat konsantrasyonu kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik bir etki gözlenmemiştir ($p>0,05$). Fakat 50 µM konsantrasyonunda apoptotik etkinin 3 kat (*: $p<0,05$), 75 µM konsantrasyonunda da kontrol grubu ile kıyaslandığında 21 kat arttığı hesaplanmıştır (*: $p<0,05$). Denenen 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonunda ise anlamlı bir nekrotik etki gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.12. Borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat süre boyunca muamele edilen A549 hücrelerinde oluşan apoptotik DNA fragmantasyon oranları (*: p<0,05). Kontrol grubunun zenginleştirme faktörü 1 (EFK:1) olarak kabul edilmiştir.

H460 hücre dizisinde denenen 25 µM borotungstat konsantrasyonu kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik bir etki gözlenmemiştir (p>0,05). Fakat 50 µM konsantrasyonunda apoptotik etkinin 7 kat, 75 µM konsantrasyonunda da kontrol grubu ile kıyaslandığında 7 kat arttığı hesaplanmıştır (*: p<0,05). Denenen 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonunda ise anlamlı bir nekrotik etki gözlenmemiştir (p>0,05).



Şekil 4.13. Borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat süre boyunca muamele edilen H460 hücrelerinde oluşan apoptotik DNA fragmantasyon oranları (*: p<0,05). Kontrol grubunun zenginleştirme faktörü 1 (EFK:1) olarak kabul edilmiştir.

Uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının her iki hücre dizisinde de sitotoksik aktiviteyi apoptotik yolla gerçekleştirdiği belirlenmiştir. A549 hücre dizisinde bu etki konsantrasyon artışına bağlı olarak yükselmişken, H460 hücre dizisinde böyle bir etkiden bahsetmek mümkün olmamıştır.

Özellikle borotungstatın A549 hücre dizisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak daha fazla apoptotik hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre dizisinde de borotungstatın herhangi bir nekrotik etkiye neden olmadığı da yapılan çalışma ile gösterilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan borotungstat bileşiğinin A549 ve H460 hücre dizilerindeki sitotoksik etkisinin mekanizmasını anlayabilmek için hücre ölümü belirleme kiti kullanımış ve apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümünden hangisinin gerçekleştiği araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan bileşik ilk kez denendiği için literatürde aynı madde ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Fakat farklı polioksometalat bileşiklerinin, farklı hücre dizileri üzerinde apoptotik/nekrotik hücre ölümüne yönelik çalışmaları mevcuttur.

Çalışmamızla benzer şekilde Xia vd., tarafından tasarlanan bir çalışmada yeni sentezlenen bir polioksometalat bileşiği 'FNdPW' olarak adlandırılmıştır. Bu bileşiğin A549 hücre dizileri üzerindeki apoptotik etkileri araştırılmıştır. Apoptoz, akridin turuncu / etidyum bromür lekelemesi ve elektron mikroskobu kullanılarak araştırılmıştır. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda FNdPW bileşiğinin A549 hücre dizilerinde konsantrasyona ve zamana bağlı şekilde apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini tespit edilmiştir (Xia vd., 2017).

Yapılan bir diğer çalışmada ise; SbW9 adlı polioksometalat bileşiğinin küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizileri olan A549 ve PC9 hücreleri üzerindeki hücre çoğalması ve apoptoz mekanizmasının anlaşılması hedeflenmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin apoptoz mekanizması, akış sitometrisi ve TUNEL metodu ile tespit edilmiştir. Apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonu western blot tekniği ile tespit edilmiştir. Akış sitometrisinin sonuçları, SbW9 adlı polioksometalat bileşiğinin, hem A549 hem de PC9 hücreleri üzerinde anlamlı bir apoptotik etkisinin bulunduğunu göstermiştir. PTEN / AKT sinyal yolunun tümördeki önemli rolü göz önüne alındığında, polioksometalat SbW9'un KHDAK hücrelerinin biyolojik davranışları üzerindeki etkisinin PTEN / AKT sinyal yoluna bağlı olup olmadığı tespit edildi. Her grupta PTEN ve AKT ekspresyonuna bakıldı ve polioksometalat SbW9'un PTEN ekspresyonunu aktive edebileceği ve iki tür hücre hattında AKT'nin

fosforilasyon seviyesini inhibe edebileceği bulundu. PTEN / AKT sinyal yolunun, polioksometalat SbW9'un anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Sun vd., 2019).

Xiao vd., tarafından yapılan bir çalışmada sentezlenen polioksometalat 1 ve 2 bileşiklerinin mesane kanseri (J82) hücrelerine karşı önemli apoptotik etkileri olduğu belirlendi. Kompleks 1 ve 2, J82 hücre dizileri üzerinde ki apoptozu önemli ölçüde indükleyebilir. Bu apoptoz, hücre içi ROS üretiminin artması ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile mitokondriyal apoptotik yolla indüklenmiştir (Xiao vd., 2019).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri, akciğer dokusu içindeki anormal hücrelerin büyümesini tarif etmek için kullanılan bir terimdir. Akciğer kanseri, toplam kanserlerin %11, 6'lık kısmı ile en sık tanı alan türdür. Akciğer kanseri, %18,4'lük bir yüzde ile kansere bağlı ölümlerde ilk sırayı almaktadır (Bray vd., 2018). Akciğer kanserinin yaklaşık %85'i küçük hücreli dışı (KHDAK) akciğer kanserleridir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri agresif bir türdür.

Bor (B), Fransız Kimyacı Gay-Lussac ve İngiliz kimyacı Humphry Davy tarafından 1808'de keşfedilmiştir. Bor küçük bir atom kütlesine sahip olduğundan ve kimyası nötrofilik ve elektrofilik reaktivite içerdiğinden, çeşitli hastalıklara karşı antiviral, antibakteriyal ve antifungal biyomedikal uygulamalara sahip yeni bir molekül sınıfını temsil etmektedir.

Yakın gelecekte, bor içeren bazı ilaçların piyasada mevcut ilaçlardan daha iyi etkinlik ve etkiye sahip olması beklenmektedir. Son yıllarda ise yapılan çalışmalarda borlu bileşiklerin kanserli hücrelerin çoğalması üzerindeki etkileri ile ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır.

Polioksometalatlar (POMs), analitik kimya, tıp, kataliz ve malzeme bilimi alanlarında yaygın olarak kullanılan önemli inorganik bileşiklerdir. Polioksometalatlar büyüleyici yapıları, katalitik, fotovoltaik, manyetik ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyle tıp ve malzeme bilimi alanlarında geniş ilgi çeken metal oksijen kümeleri sınıfıdır. (Menon vd., 2011).

Son on yıl içinde de, çeşitli polioksometalatların antiviral, anti bakteriyel ve anti-tümöral etkinliklerinin belirlenmesi bu maddelere karşı olan ilgiyi arttırmaktadır (Yamase, 2005). Bir polioksometalat çeşidi olan tungsten, geçiş metalleri ile bileşik oluşturmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan borotungstat adlı madde de bor geçiş metali olarak kullanılmış ve tungsten ile kararlı bir bileşik oluşturmuştur.

Bu çalışmada, yeni bir sentetik ajan olan borotungstat (K_{16} [Ni (H_2O) $_6]_2[BW_{12}O_{40}]_4.48H_2O$) insan akciğer kanseri hücrelerinde ilk kez test edilmiş ve bu ajanın sitotoksik, morfolojik ve apoptotik etkileri hakkında bazı ön sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmada A549 ve H460 hücre dizilerine uygulanan 10, 25, 50, 75 ve 100 µM borotungstat konsantrasyonları 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. A549 hücre dizisinde kontrole göre IC_{50} değerleri 60 ve 37 µM olarak 24 ve 48 saat için belirlenmiştir. H460 hücre dizisi ise IC_{50} değeri ise 24 saat için 51 µM, 48 saat için 31 µM olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre borotungstat her iki hücre dizisinde benzer bir sitotoksik aktivite gösterdiği ve bu etkinin doza ve zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Borotungstat maddesi farklı kanserli hücre dizilerinde de denenerek hücre canlılığı üzerindeki etkileri araştırılabilir. Akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen veriler ile yeni yapılacak çalışmanın verileri karşılaştırılabilir.

Çalışmada ayrıca akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan karboplatin ile borotungstat toksisitesi karşılaştırılmıştır. Çalışmada A549 ve H460 hücre dizileri üzerinde borotungustat karboplatine göre daha güçlü bir sitotoksik etki göstermiştir. Farklı çalışmalarla farklı anti kanser ilaçlar kullanılarak bu etki karşılaştırılabilir.

İleride yapılacak çalışmalarda farklı kanser hücre dizilerinde, çeşitli kemotöropotik ilaçlar ile birlikte borotungstatın kombine verilerek antogonistik/sinerjistik etkilerinin araştırılmasıda farklı bir çalışma konusunu oluşturmaktadır.

Uygulanan borotungstat konsantrasyonlarının her iki hücre dizisinde de sitotoksik aktiviteyi apoptotik yolla gerçekleştirdiği belirlenmiştir. A549 hücre dizisinde bu etki konsantrasyon artışına bağlı olarak yükselmişken, H460 hücre dizisinde böyle bir etkiden bahsetmek mümkün olmamıştır. Özellikle borotungstatın A549 hücre dizisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak daha fazla apoptotik hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre dizisinde de borotungstatın herhangi bir nekrotik etkiye neden olmadığı da yapılan çalışma ile gösterilmiştir.

Kanserli hücrelerin apoptozdan kaçması tedavi sürecinde en önemli sorunlardan birisidir. Bu nedenle borotungstatın apoptotik hücre ölümüne neden olduğunun belirlenmesi çalışmamızda elde edilen önemli bir veridir. İleride yapılacak çalışmalarda bu mekanizmanın aydınlatılması ile ilgili daha detaylı çalışmalar planlanabilir. Ayrıca farklı hücre dizileri üzerindeki etkileride yeni bir çalışma konusu olabilir.

Elde edilen tüm bu veriler ışığında borotungstatın akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilir bir ilaç olarak geliştirilmesinde yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aktaş, A., 2019, Platin ve Bakır Temelli *N*-Heterosiklik Karben (NHC) Komplekslerinin Antikanser Özellikleri ve Etki Mekanizmaları, BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 8 (2), 713-724.

Alley, M.C., Scudiere, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J. vd., 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Research, 48, 589-601.

Baykara, O., 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5 (3), 154-165.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., vd., 2018, Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA: Cancer Journal for Clinicans, 68, 394-424.

Bijelic, A., Aureliano, M., Rompel, A., 2019, Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer, Angewandte Chemie International Edition, 58, 2980 –2999.

Booton, R., Lorigan, P., Anderson, H., Baka, S., Ashcroft, L., 2006, A phase III trial of docetaxel/carboplatin versus mitomycin C/ifosfamide/cisplatin (MIC) or mitomycin C/vinblastine/cisplatin (MVP) in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial of the British Thoracic Oncology group (BTOG1), Annals of Oncology, 17, 1111-1119.

Changgen, F., Qiang, G., Xia, L., Hongyou H.E., 2011, Synthesis and Antitumor Activities of Rare Earth Substituted Phosphotungstates Containing 5-fluorouracil, Journal of Rare Earths, 30(5), 467.

Cheng, T.Y.D., Cramb, S.M., Baade, P.D., Youlden, D.R., Nwogu, C., vd., 2016, The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics Journal of Thoracic Oncology, 11(10), 1653-1671.

Chermann, J.C., Raynaud, M., Jasmin, C., Mathe, G., 1970, Powerful New Inhibitor of Murine Leukaemia and Sarcoma Viruses, Nature, 227, 173-174.

Daphu, I., Horn, S., Stieber, D., Varughese, J.K., Spriet, E., vd., 2014, In Vitro Treatment of Melanoma Brain Metastasis by Simultaneously Targeting the MAPK and PI3K Signaling Pathways, International Journal of Molecular Sciences. , 15, 8773-8794.

Das, B.C., Thapa P., Karki R., Schinke, C., Das, S. vd., 2013, Boron Chemicals in Diagnosis and Therapeutics, Future Medicinal Chemistry, 5(6), 653–676.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Davy, H., 1808, Electro Chemical Researches on the Decomposition of the Earth's With Observations on the Metals Obtained from the Alkaline Earth's and on the Amalgam Procured from Ammonia, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 98, 333-370.

Duma, N., Santana-Davila, R., Molina, J.R., 2019, None-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment, Mayo Clinic Proceedings, 94(8), 1623-1640.

Erdem, S.S., Yılmaz, M., Yıldırım, H., Mayda, A.S., Bolu, F., vd., 2017, Düzce'de Yaşayanların Kanser ve Kanser Risk Faktörleri Hakkında Bilgi Düzeyi, Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi , 7(1), 01-10.

Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2018, Bor Sektör Raporu, Strateji Geliştirme Dairesi Başkanlığı, sayfa 4, 21, 25.

European Food Safety Authority, 2004, Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of boron, European Food Safety Authority Journal, 2, 1-9.

Global Lung Cancer Coalition, 2013, Global Lung Cancer Coalition 2013 Survey Final Report, Ipsos Mori, Social Research İnstitue, p. 34.

Goy, A., Younes, A., McLaughlin, P., Pro, B., Romaguera J.E. vd., 2005, Phase II Study of Proteasome Inhibitor Bortezomib in Relapsed or Refractory B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma, Journal of Clinical Oncology, 23, 667-675.

Guarino, M.J., Schneider, C.J., Grubbs, S.S., Biggs, D.D., Himelstein, A.L., vd., 2002, A dose-Escalation Study of Weekly Topotecan, Cisplatin, and Gemcitabine Front-Line Therapy in Patients with Inoperable Non-Small Cell Lung Cancer, The Oncologist, 7, 509-515.

Hasenknopf, B., 2005, Polyoxometalates: Introduction to A Class of Organic Compounds and Their Biomedical Applications, Frontiers in Bioscience, 10, 275-287.

Ho, G.Y., Woodward, N., Coward, J.I.G., 2016, Cısplatın Versus Carboplatin: Comparatıve Review Of Therapeutic Management In Solid Malignancies, Critical Reviews in Oncology/Hematology.

Jansen, J. AAS., Schou, J.S., Aggerbeck B., 1984, Gastrointestinal Absorption and In Vitro Release of Boric Acid From Water-Emulsifying Ointments, Food and Chemical Toxicology, 49-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kabu, M., Akosman, M.S., 2013, Biological effects of boron, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 225, 57-75.

Kastner, J., Hossain, R., Whilte, C., 2019, Epidemiology of Lung Cancer, Seminars in Roentgenology.

Keggin, J.F., 1933, Structure of the Molecule of 12-Phosphotungstic Acid, Nature 131, 908-909.

Kemp, P.H., 1956, The Chemistry of Borates, Borox Consolidated limited S. W. 1, London, 68-71.

Kısmalı, G., Sel, T., 2012, Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 26 (2), 79 - 85.

Kuru, R., Yarat, A., 2017, Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış/Boron and a Current Overview of its Effects on Health, Clinical and Experimental Health Care, 7(3), 107-115.

Langer, C.J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E., Soria, J.C., 2010, The Evolving Role of Histology in the Management of Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer, Journal of Clinical Oncology, 28(36), 5311-5320.

Li, J., Qi, Y., Li. J., Wang, H., Wu, X. vd., 2004, Heteropolymolybdate-amino acid complexes: synthesis, characterization and biological activity. Journal of Coordination Chemistry, 57(15), 1309-1319.

Li, J., Wu, X., Li, J., Wang, H., Qi, Y. vd., 2005, A novel 5-fluorouracil salt of 12-silicatungstic acid: synthesis, structure characterization and antitumor activity, Chemical Research in Chinese Universities, 21(2), 127-130.

Li, X.H., Chen, W.L., Wei, M., Liu, J., Di, Y. vd., 2019, Polyoxometalates Nanoparticles Improve Anti-Tumor Activity by Maximal Cellular Uptake, Inorganica Chimica Acta, 486, 104-112.

Liu, X., Zhao, J., Feng, C.G., 1988, Studies on the synthesis of polyoxometalates containing sulfanilamide and their inhibition to prostate cancer cell PC-3M, Acta Chimica Sinica 64(19).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu, W., Su, J., Jiang, J., Li, X., Ye, Q. vd., 2013, Two mixed-NH_3/amine platinum (II) anticancer complexes featuring a dichloroacetate moiety in the leaving group, Scientific Reports, 3, 2464.

Meerloo, J.V., Kaspers, G.J.L., Cloos J., 2011, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, 731, 237-245.

Menon, D., Thomas, R.T., Narayanan, S., Maya, S., Jayakumara, R. vd., 2011, A novel chitosan/polyoxometalate nano-complex for anti-cancer applications Carbohydrate Polymers, 84 ,887–893.

Molina, J.R., Yang, P., Cassivi , S.D., Schild, S.E., Adjei, A.A., 2008, Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship, Mayo Clinic Proceedings, 83(5), 584-594.

Mossman, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, Journal of Immunological Methods, 65, 55, 63.

Mukherjee, H.N., 1965, Treatment of Cancer of the Intestinal Tract with a Complex Compound of Phosphotungstic Phosphomolybdic Acids and Caffeine, Journal of the Indian Medical Association, 44, 477-479.

Olgun, A., Çolak, A.T., Gübbük, H., Şahin, O., Kanar, E., 2017, A New Keggin-Type Polyoxometalate Catalyst for Degradation of Aqueous Organic Contaminants, Journal of Molecular Structure, 1134, 78-84.

Oztopcu-Vatan, P., Sayitoglu, M., Gunindi, M., Inan, E., 2015, Cytotoxic and Apoptotic Effects of Menadione on Rat Hepatocellular Carcinoma Cells, Cytotechnology, 67, 1003-1009.

Reck, M., Popat, S., Reinmuth, N., Ruysscher, D.D., Kerr, K.M., vd., 2014, Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Annals of Oncology 25 (3), 27-39.

Richardson P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A. vd., 2005, Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma, The New England Journal of Medicine, 352 (24), 87-98.

Seyhan, G., 2017, Cellular Characterization of Immune Cells in Non-Small Cell Lung Cancer and Mesothelioma, M.Sc. thesis, Istanbul Technical University Graduate School of Science Engineering and Technology, 97 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Scorei, R.I., Popa, R., 2010, Boron-Containing Compounds as Preventive and Chemotherapeutic Agents for Cancer, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 10, 346-351.

Spiro, S.G., Porter, J. C., 2002, Lung Cancer-Where Are We Today? Current Advances in Staging and Nonsurgical Treatment, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 166, 1166-1196.

Stephan, H., Kubeil, M., Emmerling, F., Müller, C.E., 2013, Polyoxometalates as Versatile Enzyme Inhibitors, European Journal of Inorganic Chemistry, 1585–1594.

Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., 2012, MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product Is In Lipid Droplets, Acta Histochemica, 114, 785–796.

Sun, H.B., Xu, L., Wang, Z.X., Zheng, Y., Zhao, Y., vd., 2019, Polyoxometalate SbW9 Regulates Proliferation and Apoptosis of NSCLC Cells via PTEN Dependent AKT Signaling Pathway, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 23, 7959-7967.

T. C. Sağlık Bakanlığı, 2015, Türkiye Kanser İstatistikleri, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf

United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2004, Toxıcologıcal Review of Boron and Compounds, In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), p.3, 4.

Yamase, T., 1993, Polyoxometalates for Molecular Devices: Antitumor Activity and Luminescence, Molecular Engineering 3, 241-262.

Yamase, T., Fukuda, N., Tajima, Y., 1996, Synergistic Effect of Polyoxotungstates in Combination with β-Lactam Antibiotics on Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 19(3), 459-465.

Yamase, T., 2005, Anti-tumor, viral, and bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug, Journal of Materials Chemistry, 15, 4773–4782.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yang, D., Liu, Y., Bai, C., Wang, X., Powell C.A., 2020, Epidemiology of lung cancer and lung cancer screening programs in China and the United States, Cancer Letters 468, 82–87.

Ye, Q.S., Xie, M.J., Liu, W.P., Chen, X.Z., Yu, Y. vd., 2009, Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Dihalogeno-platinum(II) Complexes with L-Histidine Ligand, Chemical Pharmaceutical Bulletin, 57(4) 424-427.

Ye, Q.S., Liu, W.P., Chen, X.Z., Yu, Y., Chang, Q.W. vd., 2010, Synthesis and In Vitro Cytotoxicity of Cis-[Pt(NH_3)(NH_2OH)Cl], Archive of Pharmacal Research., 33(6) 807-811.

Yildiz-Ozer, M., Oztopcu-Vatan P., Kus, G., 2018, The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non-small cell lung cancer cells in vitro, Cytotechnology, 70(1), 387-396.

Yu, Y., 2017, A novel organic–inorganic hybrid borotungstate: crystal structure and antitumor activity, Inorganic and Nano-Metal Chemistry, 47(12), 1691-1694.

Zhang, B., Qiu. J., Wu, C., Li, Y., Liu, Z., 2015, Anti-tumor and immunomodulatory activity of iron hepta-tungstenphosphate oxygen clusters complex, International Immuno pharmacology, 29, 293-301.

Zhou J., Oliveira P., Li X., Chen Z., Bepler G., 2010, Modulation of the Ribonucleotide Reductase-Antimetabolite Drug Interaction in Cancer Cell Lines, Journal of Nucleic Acids.

Wang, L., Syn, N.L.X., Subhash, V.V., Any, Y., Thuya, W.L. vd., 2018, Pan-HDAC inhibition by panobinostat mediates chemosensitization to carboplatin in non-small cell lung cancer via attenuation of EGFR signaling, Cancer Letters.

World Health Organization, 2009, Boron in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, p.1.

World Health Organization, 1998, Boron, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 204, http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc204.htm

World Health Organization, 2017, Seventıeth World Health Assembly, Geneva, Resolutıons and Decisions Annexes, p.22.

World Health Organization, https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey fact-sheets.pdf , The Global Cancer Observatory, All Rights Reserved, May, 2019.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wynder, E.L., Muscat, J.E., 1995, The Changing Epidemiology of Smoking and Lung Cancer Histology, Environmental Health Perspectives, 103(8), 143-148.

Xiao, H., Wu, B., Xue, C., Wang, F., 2019, Two New Polyoxometalate-Based Transition Metal Complexes Inhibit Bladder Cancer Cell Growth via Mitochondrial Apoptotic Pathway, Journal of Coordination Chemistry, 72(10), 1736-1746.

Xia, R.Y., Zhang, R.R., Jıang, Z., Sun, Y.J., Lıu, J., vd., 2017, $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Nd(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 25H_2O$ Induces Apoptosis in Human Lung Cancer A549 Cells, Oncology Letters 13, 1348-1352.